

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**TESIS DOCTORAL**

**Tratamiento con hormona paratiroidea de la osteoporosis producida  
por depleción androgénica: efectos sobre la calidad ósea en un modelo  
experimental en ratas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**David Serfaty Grañeda**

Directores

**Luis López-Durán Stern**

**Manuel Díaz Curiel**

**Concepción de la Piedra Gordo**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TRATAMIENTO CON HORMONA PARATIROIDEA**  
**DE LA OSTEOPOROSIS PRODUCIDA POR**  
**DEPLECIÓN ANDROGÉNICA: EFECTOS SOBRE**  
**LA CALIDAD ÓSEA EN UN MODELO**  
**EXPERIMENTAL EN RATAS**

TESIS DOCTORAL DE:  
**DAVID SERFATY GRAÑEDA**

**MADRID, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TRATAMIENTO CON HORMONA PARATIROIDEA DE LA**  
**OSTEOPOROSIS PRODUCIDA POR DEPLECIÓN**  
**ANDROGÉNICA: EFECTOS SOBRE LA CALIDAD ÓSEA EN UN**  
**MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS.**

TESIS DOCTORAL DE:  
**DAVID SERFATY GRAÑEDA**

**DIRECTORES DE TESIS**

**Luis López-Durán Stern**

**Manuel Díaz Curiel**

**Concepción de la Piedra Gordo**

**Madrid, 2015**



## Informe del Director de la Tesis Doctoral

Nombre del Doctorando	DAVID SERFATY GRAÑEDA
Título de la Tesis	TRATAMIENTO CON HORMONA PARATIROIDEA DE LA OSTEOPOROSIS PRODUCIDA POR DEPLECIÓN ANDROGÉNICA: EFECTOS SOBRE LA CALIDAD ÓSEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS
Facultad o Centro	FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	CONCEPCIÓN DE LA PIEDRA GORDO
Centro al que pertenece y dirección	DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA. FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ. MADRID. ESPAÑA
D.N.I/Pasaporte	1380846 H
e-mail	cpiedra@fjd.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad		X		
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados		X		
Discusión / Conclusiones		X		

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo estudia el efecto de la PTH sobre la calidad ósea en la osteopenia debida a la falta de andrógenos en un modelo experimental de ratas orquidectomizadas. Es especialmente destacable que el estudio aborda tanto el tratamiento preventivo como curativo. También resulta de gran interés el abordaje que se realiza mediante histomorfometría mediante el marcaje con tetraciclinas que permite estudiar aspectos dinámicos del problema.

El trabajo reúne los aspectos formales necesarios para optar al grado de Doctor.

Madrid, a 28 de octubre de 2015

Fdo.: CONCEPCIÓN DE LA PIEDRA GORDO

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



## Informe del Director de la Tesis Doctoral

<b>Nombre del Doctorando</b>	DAVID SERFATY GRAÑEDA
<b>Título de la Tesis</b>	TRATAMIENTO CON HORMONA PARATIROIDEA DE LA OSTEOPOROSIS PRODUCIDA POR DEPLECIÓN ANDROGÉNICA: EFECTOS SOBRE LA CALIDAD ÓSEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS
<b>Facultad o Centro</b>	FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
<b>Nombre Completo</b>	LUIS LÓPEZ-DURÁN STERN
<b>Centro al que pertenece y dirección</b>	DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA. FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
<b>D.N.I/Pasaporte</b>	50268437m
<b>e-mail</b>	lduranstern@gmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
<b>Originalidad</b>		X		
<b>Definición Objetivos</b>	X			
<b>Metodología</b>	X			
<b>Relevancia Resultados</b>		X		
<b>Discusión / Conclusiones</b>		X		

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

En el campo de la osteoporosis, padecimiento que aumenta con el envejecimiento de la población, los trabajos experimentales que aunan el análisis histomorfométrico con el bioquímico para valorar la respuesta a un tratamiento son de gran importancia. La mayor parte de los estudios se refieren a la forma femenina de la enfermedad y por ello el estudio en la osteoporosis masculina tiene mayor relevancia por su originalidad. El trabajo está muy bien estructurado, abarcando el análisis bioquímico de los marcadores de remodelado óseo, los estudios histológicos en hueso sin decalcificar y los marcajes con tetracilcina, etc y el estudio biomecánico son un enfoque pluridisciplinar que hace que los resultados obtenidos cumplan los criterios de objetividad necesarios para validarse como un estudio experimental de primer orden. El trabajo reúne los aspectos formales necesarios para optar al grado de Doctor.

Madrid, a 28 de octubre de 2015

Fdo.: LUIS LÓPEZ-DURÁN STERN

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



## Informe del Director de la Tesis Doctoral

<b>Nombre del Doctorando</b>	DAVID SERFATY GRAÑEDA
<b>Título de la Tesis</b>	TRATAMIENTO CON HORMONA PARATIROIDEA DE LA OSTEOPOROSIS PRODUCIDA POR DEPLECIÓN ANDROGÉNICA: EFECTOS SOBRE LA CALIDAD ÓSEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS
<b>Facultad o Centro</b>	FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
<b>Nombre Completo</b>	MANUEL DÍAZ CURIEL
<b>Centro al que pertenece y dirección</b>	SERVICIO MEDICINA INTERNA. FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ. MADRID. ESPAÑA
<b>D.N.I./Pasaporte</b>	
<b>e-mail</b>	

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
<b>Originalidad</b>		X		
<b>Definición Objetivos</b>	X			
<b>Metodología</b>	X			
<b>Relevancia Resultados</b>		X		
<b>Discusión / Conclusiones</b>	X			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo reúne los aspectos formales necesarios para optar al grado de Doctor.

Madrid, a 28 de octubre de 2015

**Fdo.: MANUEL DÍAZ CURIEL**

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

# AGRADECIMIENTOS

---

Tal vez esta sea la parte más difícil de escribir, al menos para mí. Después de tanto tiempo y tras haber sucedido tantas cosas, uno ya no sabe ni cómo organizar sus sentimientos llegado este momento.

Si algo está claro, es que este trabajo se lo debo a mis directores de tesis, la **Dra. Concha de la Piedra** por su apoyo incondicional durante todos estos años y sobre todo, por haber sabido trasladarme su profunda ilusión por la importancia de este proyecto, el **Prof. Dr. Luis López-Durán**, mi jefe en el Hospital Clínico San Carlos durante tantos años, por su tesón en transmitirme su interés y pasión por el tema de esta tesis, y su apoyo técnico y humano, y el **Dr. Manuel Díaz Curiel**, por sus aportaciones y consejos para la realización de esta tesis.

También mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al **Prof. Dr.. Fernando Marco**, mi actual jefe de servicio, por ser el promotor de este proyecto y por su perseverancia y apoyo para que el mismo haya llegado a buen puerto.

A mi compañera, la **Dra. Yaiza Lópiz**, por sostener mi esfuerzo, aliento y dedicación en la recta final de esta tesis.

Al **Dr. Rafael Otero** y el resto de mis compañeros, del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica de mi hospital, por “echarme una mano” siempre que lo he necesitado.

Al **Dr. Salvador Gómez** y a la **Dra. Teresa Carrascal** por su ayuda inestimable en la realización de la histomorfometría y estudios biomecánicos, respectivamente.

Al personal del animalario de la Fundación Jiménez Díaz, por haberme iniciado en el trato con esos “pequeños” animales protagonistas de mi estudio.

Y para finalizar, sobre todo quiero mencionar a mi mujer, **Sonsoles**, y a mis hijas, **Andrea** y **Alba**, por su paciencia conmigo y sobre todo, por su capacidad de buscar planes alternativos mientras yo realizaba esta tesis.

¡Entre todos lo hemos conseguido! Gracias.

# ÍNDICE

---



## RESUMEN

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
1. EL HUESO. COMPOSICIÓN.....	16
1.1. HIDROXIAPATITA.....	17
1.2. PROTEÍNAS DE LA MATRIZ ÓSEA.....	17
1.3. COMPONENTE CELULAR DEL TEJIDO ÓSEO.....	19
3. TEJIDO ÓSEO.....	25
4. REMODELADO ÓSEO.....	26
5. REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO.....	28
6. EFECTOS DE LOS ANDRÓGENOS SOBRE EL TEJIDO ÓSEO.....	31
7. MÉTODOS DE ESTUDIO DEL REMODELADO ÓSEO.....	34
6.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELADO ÓSEO.....	34
6.2. DENSITOMETRÍA ÓSEA.....	38
6.3. HISTOMORFOMETRÍA.....	42
6.4. ESTUDIOS BIOMECÁNICOS.....	44
8. DEFINICIÓN DE OSTEOPOROSIS.....	51
9. TIPOS DE OSTEOPOROSIS.....	53

10. LA OSTEOPOROSIS DEL VARÓN.....	56
9.1. DEFINICIÓN.....	56
9.2. CLASIFICACIÓN.....	57
9.3. HIPOGONADISMO MASCULINO Y OSTEOPOROSIS.....	58
9.4. FUNCIÓN GONADAL MASCULINA Y ENVEJECIMIENTO.....	59
9.5. TERAPIA ANDROGÉNICA Y METABOLISMO ÓSEO.....	60
9.6. PREVALENCIA DE LA OSTEOPOROSIS EN EL VARÓN.....	61
11. PERSPECTIVAS DEL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ACTUAL..	62
 <b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
 <b>III. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>70</b>
3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACION.....	71
3.2. ORQUIDECTOMÍA.....	74
3.3. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA PTH.....	76
3.4. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.....	77
3.5. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA.....	79
3.6. ESTUDIOS HISTOMORFOMÉTRICOS.....	81
3.7. MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO.....	97

3.8. ESTUDIO BIOMECÁNICO DEL HUESO.....	98
3.9. ESTADÍSTICA APLICADA.....	102
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>104</b>
4.1. DENSITOMETRÍA MINERAL ÓSEA POR DEXA.....	104
4.2. HISTOMORFOMETRÍA.....	105
4.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELADO ÓSEO.....	117
4.4. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	118
4.5 ESTUDIOS BIOMECÁNICOS.....	118
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>120</b>
<b>VI. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y DIRECTICES FUTURAS.....</b>	<b>139</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>145</b>
<b>IX. ANEXO .....</b>	<b>160</b>

# RESUMEN

---

## Resumen

**Introducción:** La calidad ósea viene determinada por una serie de factores diversos entre los que presentan especial importancia la propia densidad mineral ósea (DMO), el remodelado óseo y las propiedades biomecánicas del hueso.

**Hipótesis y Objetivos:** El objetivo de este trabajo es el estudio del efecto que produce la orquidectomía (OQX) en ratas sobre estos factores, así como los efectos producidos por la administración de hormona paratiroidea (1-34 PTH) ( $4 \times 10^{-6}$  g/kg/día) vía subcutánea, tanto a nivel preventivo como curativo.

**Material y método:** Se han estudiado 97 ratas Wistar macho de 9 meses de edad que fueron operadas de forma simulada (SHAM) u orquidectomizadas (OQX) y se repartieron en 2 estudios: preventivo y curativo.

Se determinaron la DMO en columna y fémur por absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA). estudios histomorfométricos, marcadores de formación y resorción ósea y propiedades biomecánicas (momento torsor, rigidez, ángulo girado, energía absorbida y tensión cortante máxima).

**Resultados:** La OQX produjo un descenso significativo sobre la densidad mineral ósea (fémur:  $0.276 \pm 0.020a$ , columna:  $0.222 \pm 0.018a$ ) y el BV/TV (porcentaje de la cantidad de hueso). El tratamiento con PTH mejoró los niveles de DMO tanto en el grupo de prevención (fémur/lumbar:  $0.332 \pm 0.008b,c$ / $0.272 \pm 0.017b,c$ ) como en el grupo de tratamiento (fémur/lumbar:  $0.306 \pm 0.017c$ / $0.257 \pm 0.006c$ ), e igualmente provocó un incremento en el BV/TV. No

se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en cuanto a los estudios biomecánicos en los grupos de estudio.

**Conclusiones:** La administración de PTH, tanto por prevención como por tratamiento, restaura los niveles de la DMO en las ratas OQX, aunque los niveles de remodelado óseo, especialmente los de formación, de los animales tratados sufren un incremento significativo frente a los controles. Las propiedades biomecánicas del hueso en ratas OQX son similares a las de las ratas control, sugiriendo que la PTH no tiene efectos negativos sobre la calidad del hueso.

**PALABRAS CLAVE:** tratamiento con PTH, orquidectomía, ovariectomía, calidad ósea.

## Summary

**Introduction:** Bone quality is determined by a variety of factors, among which bone mineral density (BMD), bone remodelling and biomechanical properties of bone have special importance.

**Hypothesis and Objectives:** The purpose of this work is to study changes produced by orchidectomy on these factors, and the effects produced by subcutaneous PTH-administration ( $4 \times 10^{-6}$ g/kg/day), at preventive and treatment level.

**Material and Methods:** Ninety-seven male Wistar rats, 9 months old, SHAM-operated (SHAM), orchidectomized (OQX); treated and non-treated with PTH were studied; and they were distributed into two studies: prevention and treatment.

Lumbar BMD and femoral BMD were measured by DEXA, trabecular-volume histomorphometric assays, formation and resorption markers and biomechanical properties (maximum torque, angular deformation, rigidity and absorbed energy) were also measured.

**Results:** Orchidectomy produced a significant decrease on bone mineral density (femur:  $0.276 \pm 0.002$ th column:  $0.222 \pm 0.0018$ th) and BV / TV. Treatment with PTH levels DMO improved both the prevention group (femur / lumbar:  $0.332 \pm 0.008$ b, c /  $0.272 \pm 0.017$ b, c) and the treatment group (femur / lumbar:  $0.306 \pm 0.017$ c /  $0.257 \pm 0.006$ c) and also caused an increase in BV / TV. No statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in terms of biomechanical studies in the different groups were found. t.

**Conclusions:** PTH administration on a preventive and treatment level restores BMD levels in OQX rats, although bone remodeling levels, especially formation markers, in treated animals suffered a significant increase with respect to control group. Biomechanical properties of bone in OQX were similar to those of the control group, suggesting that PTH do not produce negative effects on bone quality.

**KEY WORDS:** treatment with PTH, orchidectomy, ovariectomy, bone quality.



# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1. EL HUESO. COMPOSICIÓN

El hueso es un órgano que junto con el cartílago forma el sistema esquelético.

Este tejido tiene tres funciones: **mecánica**, como soporte u órgano de locomoción; **protectora**, para órganos vitales y médula ósea; y **metabólica**, como reserva de iones para el mantenimiento de la homeostasis [Navarro A et al].

Está constituido fundamentalmente por un componente mineral o inorgánico (65%), una matriz orgánica (33%) y un componente celular (2%) [Reginster JY et al].

El componente inorgánico o mineral de la matriz ósea está constituido en su mayor parte por fosfato cálcico en forma de cristales de **hidroxiapatita**. [ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] y en menor proporción por  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , citratos,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , sulfatos, etc.

La matriz orgánica se halla integrada por colágeno tipo I (85-90%) y una pequeña proporción (10-15%) de otras proteínas: proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular, osteocalcina y factores de crecimiento [Rapado A et al].

El componente celular está formado principalmente por los osteoblastos o células formadoras de hueso y los osteoclastos o células destructoras de hueso. También encontramos osteocitos, considerados como el sistema celular que responde a la deformación mecánica en el hueso. Al estar el hueso en

contacto con la médula ósea e infiltrado de vasos sanguíneos, las células óseas se encuentran bajo la acción directa de un gran número de factores locales y de hormonas sistémicas.

### **1.1. HIDROXIAPATITA**

La hidroxiapatita es el componente mineral del hueso, al que proporciona la resistencia a la compresión. La formación de los cristales de hidroxiapatita está mediada por la presencia de fosfatasa alcalina (FA), necesaria para hidrolizar los ésteres de fosfato y poner en contacto el fosfato con el calcio.

### **1.2. PROTEINAS DE LA MATRIZ ÓSEA**

La matriz ósea extracelular está compuesta principalmente por colágeno tipo I. Otras proteínas de tipo no colágeno conforman el 10-15% del contenido total de las proteínas óseas. Una cuarta parte de estas proteínas no colágenas tienen un origen exógeno y son atrapadas en la matriz ósea. Entre las proteínas no colágenas se encuentran, las que participan en la adhesión de las células, como la fibronectina, la trombospondina, osteonectina y sialoproteína ósea; los proteoglicanos, que son moléculas que contienen cadenas de polisacáridos ácidos anclados al núcleo central de una proteína, por ejemplo, el condroitín sulfato; y las proteínas  $\gamma$ -carboxiladas como la osteocalcina o BGP (Bone Gla Protein), la proteína Gla de la matriz y la proteína S [Wiktorowitch et al]

## COLÁGENO

El colágeno es el principal componente orgánico de la matriz ósea extracelular, constituye cerca del 90% de las proteínas óseas y es casi exclusivamente colágeno tipo I.

La molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas  $\alpha 1$  y una cadena estructuralmente similar, pero genéticamente diferente  $\alpha 2$  [Rossert J et al]. Es sintetizada en el interior de los osteoblastos como un precursor, el procolágeno tipo I, molécula que contiene en ambos extremos extensiones adicionales proteicas, la extensión amino terminal de aproximadamente 25.000 dalton, y la extensión carboxilo terminal de 35.000 dalton. La parte central de la molécula tiene aproximadamente 100.000 dalton. Estas extensiones son denominadas propéptido amino terminal del procolágeno tipo I (PINP) y propéptido carboxilo terminal del procolágeno tipo I (PICP). En el medio extracelular este precursor sufre el efecto de peptidasas específicas que separan los propéptidos respectivos de la molécula, liberándose tres proteínas. Una de ellas es la molécula de colágeno propiamente dicha, que se agregará formando fibras en la conformación de la matriz ósea. Las otras dos moléculas son los propéptidos amino y carboxilo terminales del colágeno tipo I (PINP y PICP) que pasan a la circulación sanguínea [Ray FR et al].

A medida que el procolágeno tipo I es procesado, se liberan cantidades estequiométricas de ambos propéptidos, PINP y PICP, en proporciones 1:1 con el colágeno formado, por lo que la concentración de estos propéptidos refleja la síntesis de colágeno tipo I. Si se tiene en cuenta que el 90% del colágeno tipo I

corporal constituye la matriz orgánica del hueso, los niveles circulantes de ambos propéptidos se pueden considerar como un índice de actividad osteoblástica o formación ósea [Melton LJ et al].

#### 1.2.2. OSTEOCALCINA.

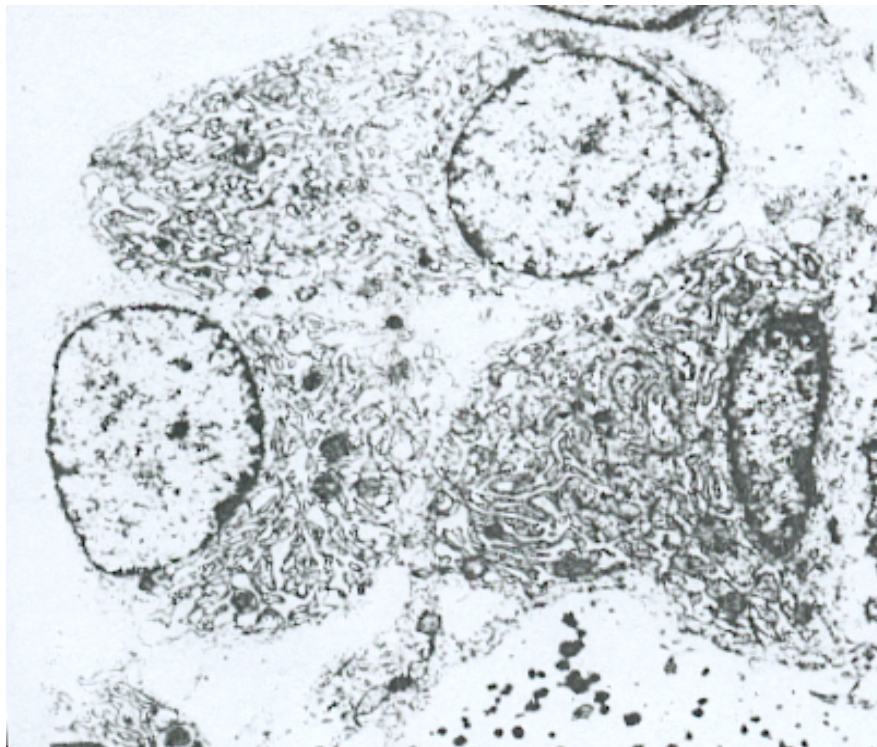
La osteocalcina o BGP (Bone Gla Protein), constituye el 10-20% de las proteínas no colágenas del hueso dependiendo de la edad y de la especie, y cerca del 2% de las proteínas totales del mismo. Es un polipéptido de 49 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 5.000 dalton [Fleish H et al]. Contiene tres residuos del aminoácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) en las posiciones 17, 19 y 24 de su secuencia, que le confiere la capacidad de unirse al calcio, y de manera más específica a la hidroxiapatita del hueso, de manera que la mayor parte de la osteocalcina sintetizada por el osteoblasto permanece en el hueso. Sin embargo, parte de la osteocalcina pasa al suero donde puede detectarse. **Dado que su procedencia es específica del osteoblasto, los niveles de osteocalcina constituyen un marcador bioquímico muy específico de actividad osteoblástica [Orwoll ES et al], y como tal se utilizará en el presente trabajo.**

### 1.3. COMPONENTE CELULAR DEL TEJIDO ÓSEO.

#### 1.3.1. OSTEOLASTOS.

Los osteoblastos son las células esqueléticas responsables de la síntesis y mineralización de la matriz extracelular del hueso. Se originan a partir de células pluripotenciales mesenquimales locales, que ante estímulos adecuados proliferan y se diferencian en preosteoblastos y en osteoblastos maduros [Seeman E et al].

Nunca se encuentran ni funcionan de manera aislada, siempre están agrupados a lo largo de la superficie del hueso. Son células cuboidales, con un núcleo redondo excéntrico, opuesto a la superficie del hueso, y con un citoplasma intensamente basófilo con retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien desarrollados, característica vinculada con la capacidad de producir y segregar las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz ósea (Figura 1).



**Fig. 1: Micrografía electrónica de 3 osteoblastos en una capa de tejido osteoide.** Muestran un prominente aparato de Golgi y retículo endoplásmico, característicos de osteoblastos activos. (Fotografía tomada de Sims N and Baron R. 2000 Bone Cells and their function. In Skeletal Growth Factors. Edited by Canalis E. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1-16).

La membrana plasmática de los osteoblastos es rica en **fosfatasa alcalina**. Esta propiedad se utiliza para reconocer los osteoblastos en tinciones histológicas. La fosfatasa alcalina está directamente implicada en el proceso de mineralización, por ello su concentración en el suero se utiliza como índice de actividad osteoblástica.

Los osteoblastos presentan receptores en su membrana para un gran número de factores sistémicos, entre ellos la **hormona paratiroidea** (PTH), el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), las hormonas tiroideas, la insulina, la progesterona y la hormona de crecimiento (GH). **También presentan receptores nucleares para los andrógenos**, los estrógenos, los glucocorticoides y la vitamina D. Además, los osteoblastos poseen receptores para las integrinas, moléculas que contribuyen a la adhesión de los osteoblastos a la superficie ósea [Postel Vinay MC et al, Ericen EF and Colvard DS et al, Abu EO et al]. El fenotipo de osteoblasto maduro se caracteriza por la capacidad de las células para sintetizar proteínas de la matriz ósea.

Los osteoblastos también sintetizan factores de crecimiento que son almacenados en la matriz ósea, tales como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), así como diversos factores locales y citoquinas, entre las que se encuentran la interleukina 6 (IL-6), la osteoprotegerina (OPG) y el ligando de receptor activador NF-KB (RANKL).

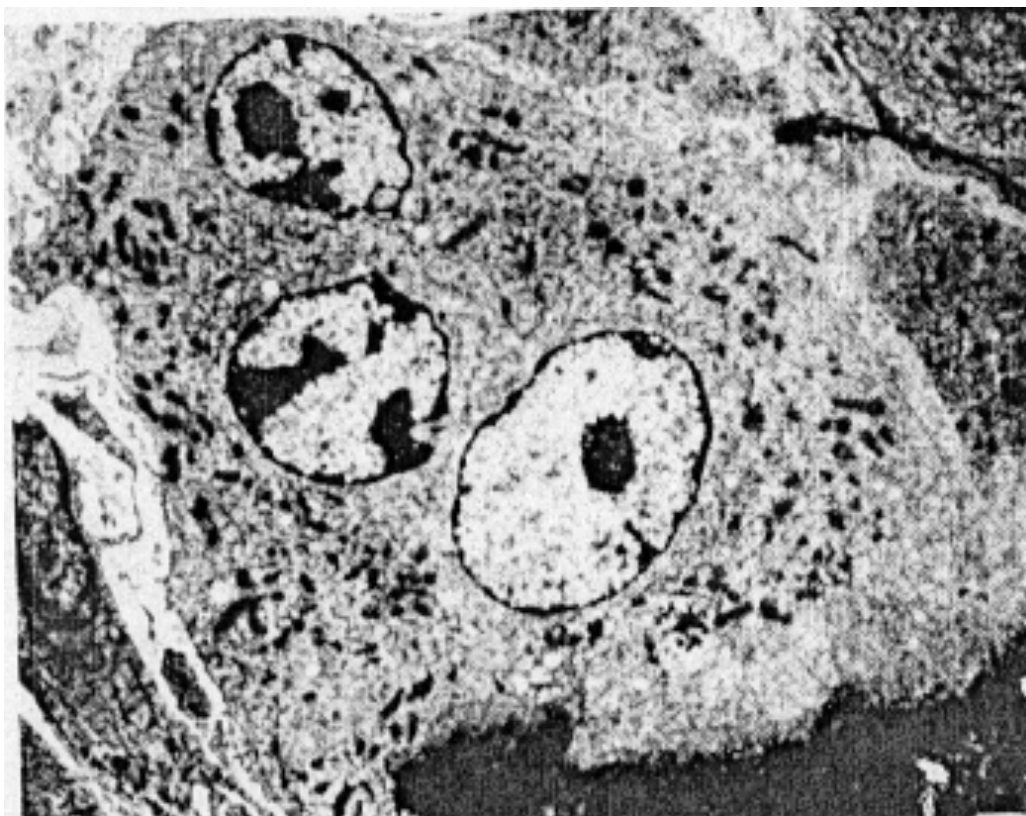
### 1.3.2. OSTEOCLASTOS.

Los osteoclastos son las células óseas responsables de la resorción o destrucción del hueso. Realizan las funciones opuestas a los osteoblastos: disolución del mineral óseo y degradación de la matriz.

Derivan de las células mononucleares hematopoyéticas de la médula ósea. En presencia de osteoblastos, los precursores proliferan y se funden para formar células multinucleadas que son los osteoclastos [Baron R et al].

Son células de gran tamaño (100  $\mu\text{m}$  de diámetro), multinucleadas, normalmente contienen de 4 a 20 núcleos (figura 2). Poseen gran número de vacuolas con enzimas lisosomales y colagenasas responsables de la disolución del hueso; además, la membrana celular del osteoclasto tiene un borde exterior rugoso o en cepillo a través del cual ejerce su acción destructora del hueso (Figura 2). No están agrupados como los osteoblastos; en un lugar resortivo pueden encontrarse de 1 a 5 osteoclastos [Karlsson MK et al, Fujisawa Y et al].



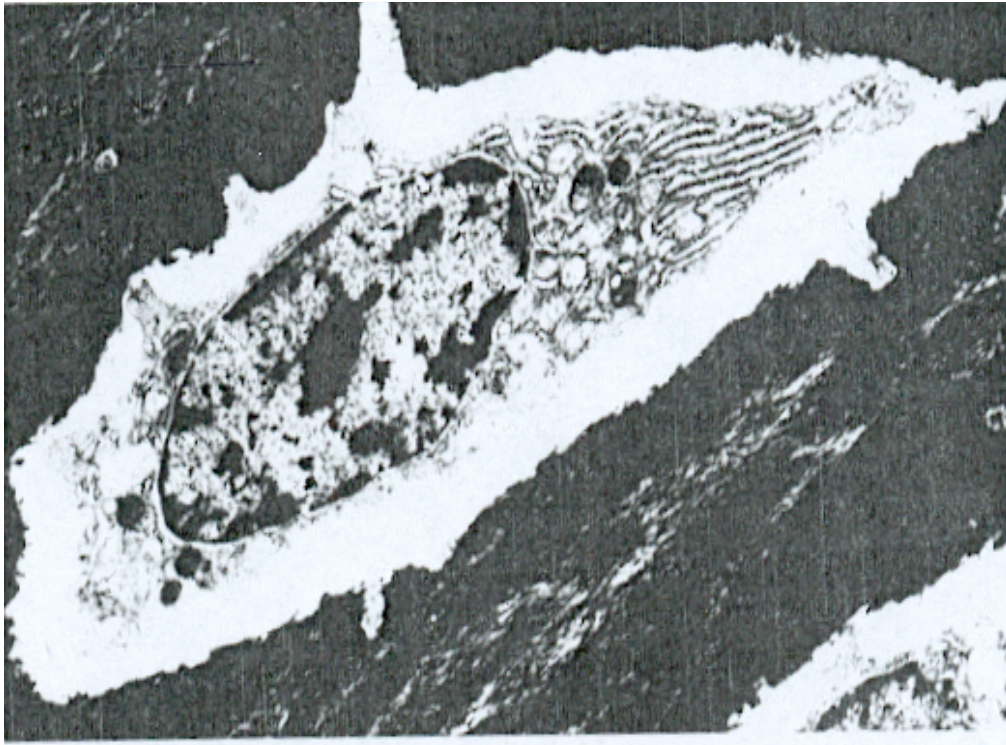


**Fig. 2: Micrografía electrónica de 3 osteoclastos.** Muestran el borde exterior de la membrana celular rugoso y numerosos núcleos en su interior. (Fotografía tomada de Sims N and Baron R. 2000 Bone Cells and their function. In Skeletal Growth Factors. Edited by Canalis E. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1-16).

### 1.3.3. OSTEOCITOS.

Los osteocitos son células de la línea osteoblástica, derivan de los osteoblastos que quedaron atrapados en la matriz ósea construida por ellos mismos y que comenzó a calcificarse; estas células todavía producen proteínas de la matriz.

La morfología de los osteocitos (figura 3) varía en función de la edad y de su actividad funcional. Participan en el remodelado óseo en el ámbito local [Manolagas SC et al].



**Fig. 3: Micrografía electrónica de un osteocito en la matriz ósea calcificada.** Posee un núcleo basal, extensiones citoplasmáticas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien desarrollados. (Fotografía tomada de Sims N and Baron R. 2000 Bone Cells and their function. In Skeletal Growth Factors. Edited by Canalis E. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1-16).

## 2. TEJIDO ÓSEO.

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo especializado cuya matriz extracelular se halla mineralizada en su mayor parte.

**El tejido óseo** según su estructura, se clasifica en cortical y trabecular.

1. El **hueso cortical o compacto**, se presenta como una masa sólida y continua de tejido óseo en la cual los espacios únicamente pueden percibirse al microscopio.
2. El **hueso trabecular o esponjoso**, está constituido por un retículo tridimensional de espículos (o trabéculas) de tejido óseo, que delimitan un sistema laberíntico de espacios intercomunicantes ocupados por la médula ósea.

No existe un límite claro y neto entre estos dos tipos de tejido óseo, y el paso de uno a otro se hace a través de una progresiva transición.

La distribución del hueso cortical o trabecular varía dependiendo del tipo de hueso. Así el tejido trabecular abunda en la epífisis de los huesos largos, en los huesos cortos y en la capa central de los huesos planos. El hueso cortical abunda, por el contrario, en las diáfisis de los huesos largos y en lámina de los huesos planos.

### **3. REMODELADO ÓSEO.**

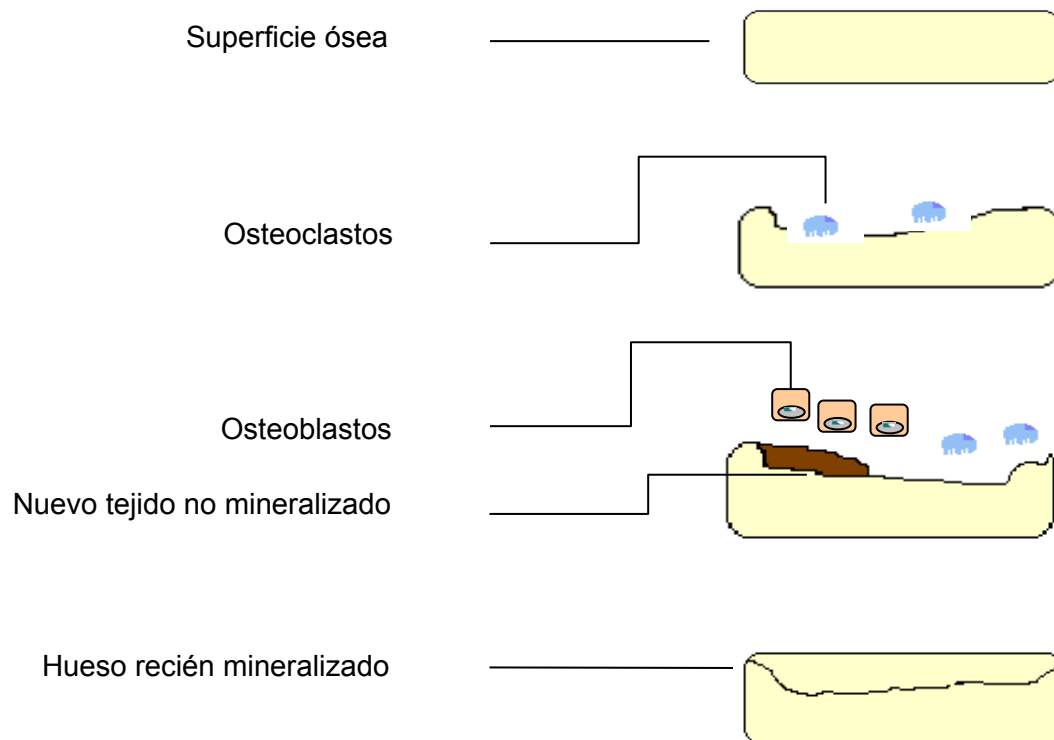
La integridad estructural y anatómica del esqueleto es mantenida por la renovación constante del hueso, lo cual es posible a través de un mecanismo de recambio continuo denominado remodelado óseo (figura 4). Este proceso mediante el cual se produce la sustitución del hueso viejo por hueso de nueva formación se desarrolla en una fase inicial de resorción osteoclástica seguida por una fase más prolongada de formación ósea mediada por osteoblastos.

En la fase resortiva, los osteoclastos se fijan a la superficie ósea, destruyen el hueso por acidificación y disolución de los cristales de hidroxapatita y por una posterior proteólisis de la matriz ósea; esta actividad resortiva origina una bahía de resorción denominada laguna de Howship [Malluche HH et al]. La unión de los osteoclastos a la superficie ósea es esencial para la resorción ósea. En este proceso actúan receptores de adhesión de transmembrana de la familia de las integrinas [Sims N et al, Nogues X et al]. A continuación, en la fase de formación ósea, los osteoblastos emigran hasta la superficie ósea destruida y producen nuevo tejido no mineralizado rellenando la cavidad previamente formada por los osteoclastos. La nueva matriz ósea sintetizada sufre un proceso de mineralización con cristales de hidroxapatita.

Cada ciclo de remodelado dura 3-4 meses en el hombre y 30-40 días en la rata [Thompson DD et al].

En la vida adulta, en condiciones normales, la cantidad de hueso que se destruye es similar a la que se forma, hecho que se denomina acoplamiento. Existen sin embargo, una serie de situaciones patológicas en las que las fases

del remodelado óseo no están en equilibrio, produciéndose alteraciones importantes en el hueso, como por ejemplo la osteoporosis.



**Fig. 4: Esquema del remodelado óseo.**

#### 4. REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO.

El proceso de remodelado óseo está regulado por hormonas sistémicas y factores locales que son los que controlan el reclutamiento, la replicación, la diferenciación y la actividad tanto de las células de la línea osteoblástica como de la línea osteoclástica. También está demostrada la implicación de los estímulos mecánicos en el proceso de remodelado óseo [Manolagas SC et al].

Las principales hormonas involucradas en la regulación del remodelado óseo son la PTH, la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y la calcitonina, reguladas fundamentalmente por las concentraciones de calcio extracelular. **Otras hormonas sistémicas que influyen sobre las funciones de las células óseas, pero que no están directamente reguladas por el calcio del fluido extracelular, son los andrógenos**, estrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento.

En general, el modo de acción de los factores sistémicos sobre las células óseas es producir una variación en los niveles de determinados factores locales, lo que conduce a la acción fisiológica correspondiente.

Los factores locales reguladores del remodelado óseo incluyen factores de crecimiento, prostaglandinas y citoquinas.

Los factores de crecimiento son polipéptidos que regulan la replicación y la función de las células diferenciadas. Pueden funcionar como factores autocrinos o paracrinos. Los factores de crecimiento también están presentes en la circulación y pueden actuar como reguladores sistémicos del metabolismo esquelético y no esquelético, pero los factores producidos localmente tienen una función más directa y posiblemente más importante en el crecimiento

celular. El hueso es una rica fuente de factores de crecimiento con importantes acciones en la regulación de la formación y resorción ósea, entre ellos se pueden citar el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) [Alberts B et al, Elmardi AS et al; Aubin JE et al].

Las prostaglandinas son los únicos reguladores locales del remodelado óseo que no tienen estructura polipeptídica. Aunque no está bien descrita su función, se les atribuye una acción reguladora de la expresión del IGF en células óseas [Bargsten G et al].

El tercer grupo de factores locales reguladores del remodelado óseo son las citoquinas. Se trata de factores inmunohematopoyéticos que son producidos en el microambiente del hueso por las células de la médula ósea, por células estromales o por osteoblastos [Elmardi AS et al], y que actúan sobre las células esqueléticas tanto en el mecanismo de formación como en el de resorción, además de ejercer funciones reguladoras de la respuesta inmune. Son pequeños péptidos o glicoproteínas con pesos moleculares entre 6 y 60 kilodalton (kDa).

Las citoquinas con efectos sobre las células óseas pueden dividirse en interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-1,...), factores estimulantes de colonias (M-CSF y GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Más recientemente se ha descrito un grupo de factores que regulan la diferenciación osteoclástica, que son factores relacionados con TNF y la familia del receptor del TNF. Son el factor de diferenciación osteoclástica o ligando del

receptor activador del factor nuclear NF- $\kappa$ B (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) [Ranz LG et al, Canalis E et al, Lanske B et al].

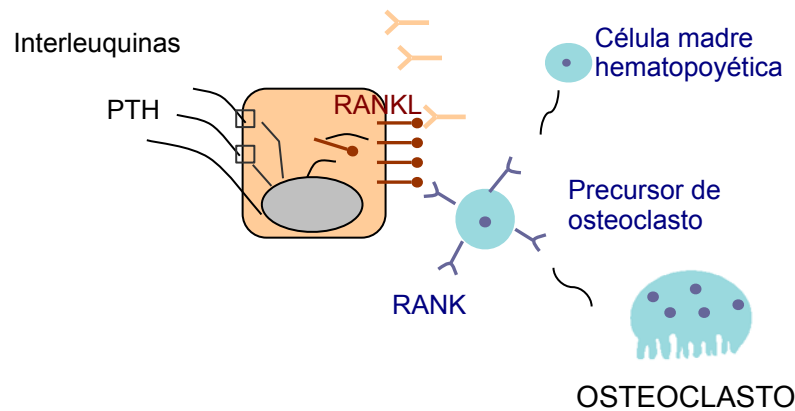
El RANKL es un potente factor resorptivo del hueso sintetizado por las células de la línea osteoblástica [Eriksen EF and Colvard DS et al]. Su síntesis puede estar inducida por tres vías de transducción de señales (figura 5), la ruta del receptor de la vitamina D, mediada por la activación producida por la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>; la ruta del AMP cíclico (AMPc), mediada entre otras hormonas por la PTH; y la ruta de gp 130 (glicoproteína de 130 kDa), a través de la cual actúa la IL-6 entre otras citoquinas. El RANKL actúa sobre los progenitores de osteoclastos, para inducir su maduración [Colvard DS and Eriksen EF et al] El RANKL, junto con el M-CSF, es indispensable para el desarrollo de la resorción osteoclástica. Para el inicio de la activación de la osteoclastogénesis el RANKL se une a su receptor, RANK, situado en la superficie de los precursores de osteoclastos.

Es importante mencionar que la IL-6 no sólo activa la resorción ósea a través de la síntesis de RANKL, sino que también activa la osteoclastogénesis por otra vía independiente [Clover J et al, Watson P et al].

La OPG es una proteína sintetizada también por el osteoblasto que bloquea los efectos del RANKL modulando negativamente la activación y el desarrollo de los osteoclastos [Pfeilschfter J et al]. OPG actúa como receptor soluble del RANKL evitando así la unión de éste a su receptor RANK. Por tanto, los efectos biológicos de la OPG son antagónicos a los ejercidos por el RANKL; la OPG produce inhibición de la diferenciación y activación osteoclástica e inducción de la apoptosis de estas células.



En la figura 5 se resumen las tres vías implicadas en la activación de la resorción osteoclástica.



**Fig. 5: Las tres vías de transducción de señales que se han considerado clásicamente como responsables de la activación de la resorción osteoclástica.**

## **5. EFECTOS DE LOS ANDRÓGENOS SOBRE EL TEJIDO ÓSEO**

Los andrógenos son hormonas esteroideas, derivadas de los ésteres de colesterol, sintetizados en el tejido gonadal (células de Leydig testiculares en el varón y ovario en la mujer) y en la capa reticular de las glándulas suprarrenales, responsables del desarrollo de los caracteres sexuales masculinos.

Las principales hormonas con efecto androgénicos son la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT), de origen gonadal, y la androstendiona, la dihidroepiandrosterona y la dihidroepiandrosterona-sulfato de origen reticular (Figura 6).

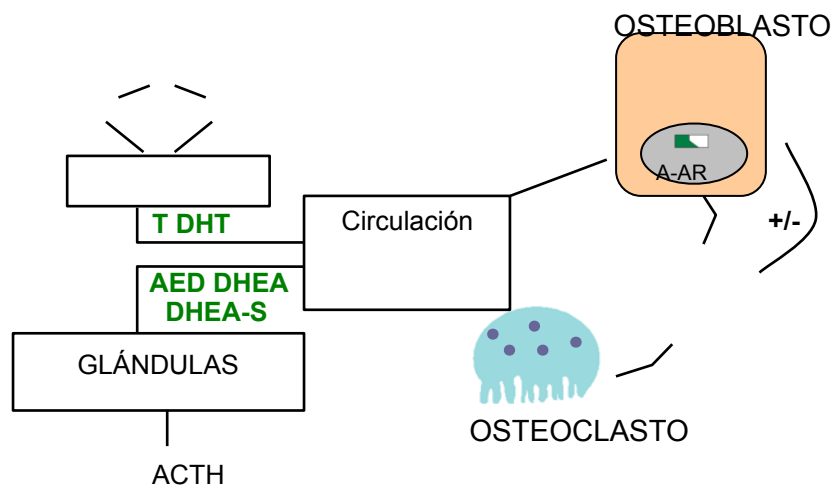
Tanto la testosterona como la DHT ejercen su acción después de unirse a los receptores androgénicos situados en las células diana de estas hormonas (próstata, vesículas seminales, conductos deferentes...). **Se ha demostrado que los osteoblastos, células formadoras de hueso, también poseen receptores androgénicos** [Colvard DS and Eriksen EF et al].

Los andrógenos, al igual que la mayoría de las hormonas del organismo, intervienen en la regulación del metabolismo óseo. Si bien la regulación fundamental de la masa ósea depende de la parathormona y de los metabolitos de la vitamina D, los andrógenos desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología del sistema óseo y de hecho todo el sistema endocrino está íntimamente interrelacionado en la regulación hormonal.

**Los efectos fundamentales de los andrógenos en el hueso son claramente anabólicos, de forma que facilitan la actividad osteoblástica, estimulando la formación del hueso** [KasperK CH and Wergedal JE et al, Vanderschueren D et al]. Estimulan la actividad de proliferación y diferenciación celular, aumentando la producción de fosfatasa alcalina y TGF (transforming growth factor). Estos efectos, mediados por la unión andrógeno-receptor, se inhiben por la flutamida, antagonista del receptor de los andrógenos. Respecto al efecto relativo de los diferentes andrógenos parece que la DHT es el andrógeno intracelular más activo en el hueso humano. En estudios in vitro de osteoblastos en un modelo de osteosarcoma, se ha demostrado, así mismo

que la DHT estimula directamente la mineralización ósea [Kasperk C, Helmboldt A et al].

**Los andrógenos inhiben indirectamente la reabsorción ósea, mediante una inhibición del reclutamiento de los precursores de los osteoclastos, disminuyendo la secreción de IL-6 y prostaglandina E2.**



**Fig. 6: Esquema principal del origen de los principales andrógenos. Actuación sobre las células óseas.**

## **6. MÉTODOS DE ESTUDIO DEL REMODELADO ÓSEO**

Actualmente, para el estudio de los pacientes con osteoporosis existen múltiples técnicas que permiten cuantificar la masa ósea y valorar el estado del recambio metabólico. La técnica ideal es la que cumple los siguientes requisitos: diagnóstico, pronóstico y monitorización de los cambios óseos.

El método óptimo debe distinguir entre los pacientes que tienen unos huesos frágiles y los que mantienen una resistencia ósea normal. Teniendo en cuenta esta premisa, la estrategia en el diagnóstico de la osteoporosis se fundamenta en tres aspectos:

1. La medición de la masa ósea
2. Los factores de riesgo clínico de osteoporosis y/o de fracturas
3. Las pruebas de laboratorio indicadoras del metabolismo óseo (cuantificación de marcadores bioquímicos de remodelado óseo, ver apartado 6.1)

En estudios experimentales, principalmente en modelos animales de experimentación, las pruebas o ensayos biomecánicos proporcionan datos de gran interés acerca de la resistencia ósea, parámetro que está englobado en el concepto de calidad ósea.

### **6.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO**

Los marcadores de remodelado nos permiten medir a través de determinaciones séricas o urinarias la tasa de formación o de resorción del

hueso [De la Piedra C]. Se utilizan para medir el grado de actividad de osteoblastos (formación ósea) y de los osteoclastos (resorción ósea). Son sustancias (enzimas, minerales, péptidos) que pueden medirse en el suero y orina de los individuos para determinar el estado del remodelado de los mismos. Dicha medida se puede realizar, mediante la cuantificación sérica de una actividad enzimática propia del osteoblasto o del osteoclasto activo (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida tartrato resistente), a través de la medida de productos específicos sintetizados por las células óseas (osteocalcina, propéptidos) o determinando los componentes de degradación vertidos a la circulación durante la resorción ósea (calcio, hidroxiprolina, piridinolinas, telopéptidos).

Estos marcadores se clasifican en indicadores de formación y de resorción óseas. Los marcadores de formación ósea miden la actividad osteoblástica, mientras que los marcadores de resorción ósea reflejan la actividad osteoclástica (Tabla 1).

<b>MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA</b>
<b>Actividad enzimática osteoblástica</b>
Fosfatasa alcalina total (FA)
Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina
<b>Péptidos sintetizados por el osteoblasto</b>
Osteocalcina (BGP)

Propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP)
Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP)
<b>MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA</b>
<b>Actividad enzimática osteoclástica</b>
Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR)
<b>Derivados de la degradación ósea</b>
Cociente calcio/creatinina
Hidroxiprolina
Piridinolina y desoxipiridinolina
Telopéptidos carboxiterminales del colágeno I unidos por puentes de piridinolina (ICTP)
Telopéptidos aminoterminal del colágeno I unidos por puentes de piridinolina (NTX)
Telopéptidos carboxiterminales de la cadena alfa-1 del colágeno tipo I (CTX, CROSSLAPS)

**Tabla 1: Marcadores Bioquímicos de remodelado óseo.**

#### **6.1.1. MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO UTILIZADOS EN EL PRESENTE TRABAJO**

Analizaremos a continuación de manera más detallada los marcadores de remodelado utilizados en el presente trabajo.

##### **6.1.1.1. Fosfatasa Alcalina total.**

La fosfatasa alcalina es una enzima tetramérica, ubicua, vinculada a las porciones del glicisil-fosfatidilinositol situadas en la cara externa de la membrana celular. La función exacta de la enzima aún es desconocida, pero obviamente juega un papel importante en la formación del osteoide y la mineralización.

La fosfatasa alcalina que circula en suero consiste en varias isoformas diméricas que se originan en diversos tejidos como el hígado, el hueso, el intestino, el bazo, el riñón y la placenta. Es un marcador clásico de actividad osteoblástica pero presenta el problema de su falta de especificidad, debido a la presencia en el suero de las isoenzimas hepática y renal, y en ocasiones intestinal y la placentaria. En adultos con la función hepática normal, aproximadamente el 50% de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero se deriva del hígado, mientras que el otro 50% procede del hueso.

#### *6.1.1.2. Osteocalcina.*

La osteocalcina (Bone Gla Protein, BGP), es una proteína de 49 aminoácidos, sintetizada por los osteoblastos. Su principal característica estructural es la presencia en su secuencia en posiciones 19, 21 y 24, del aminoácido gamma-carboxi-glutámico (Gla). A través del Gla, la osteocalcina es capaz de unirse a la fase mineral del hueso. Por ello cuando esta proteína es liberada por el osteoblasto, una parte pasa al suero y otra se une a la fase mineral del hueso. Debido a que la parte que pasa al suero es directamente proporcional a la cantidad sintetizada por el osteoblasto, la osteocalcina se utiliza desde los años 80 como marcador bioquímico de formación ósea.

Los niveles séricos de osteocalcina se ha visto que se correlacionan perfectamente con la tasa de formación ósea obtenida por histomorfometría [Diaz Diego et al].

#### *6.1.1.3. Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX).*

El telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX), es un péptido, producto de degradación del colágeno tipo I contra el que se han desarrollado recientemente anticuerpos. Se trata de un fragmento de ocho aminoácidos perteneciente a la zona telopeptídica C-terminal de una cadena alfa1 del colágeno I. Cuando el colágeno no se ha degradado todavía, el segundo aminoácido está implicado en la formación de un puente piridinolínico.

Recientemente se ha descubierto que el fragmento de CTX, es susceptible de isomerización. Dentro de su secuencia de 8 aminoácidos (EKAHDGGR), la unión DG es un lugar potencial de  $\beta$ -isomerización. De hecho, en el colágeno recién sintetizado el CTX tiene una estructura lineal ( $\alpha$ -CTX), pero el grado de  $\beta$ -isomerización ( $\beta$ -CTX) aumenta al aumentar la edad del colágeno óseo.

Es posible que la medida de la proporción de niveles entre la forma  $\alpha$ -CTX y  $\beta$ -CTX nos permita evaluar no sólo la cantidad de hueso, sino también su calidad [Mann V et al].

## **6.2. DENSITOMETRÍA ÓSEA**

La densitometría ósea constituye, sin lugar a duda, la técnica por excelencia para la medida de la densidad mineral ósea.



Como se explicó en el apartado 1, el hueso está compuesto por una red de proteínas, siendo el colágeno tipo I la predominante, en las que se deposita la hidroxiapatita cálcica. Este conjunto integrado es la denominada matriz ósea. El calcio se caracteriza, frente a otros átomos del cuerpo, porque absorbe más radiación que los componentes de las proteínas o los tejidos blandos. La cantidad de rayos X que es absorbida por el calcio en un determinado punto refleja la cantidad de depósitos minerales o de contenido mineral óseo (CMO). El CMO dividido por el área o el volumen del hueso proporciona la densidad mineral ósea (DMO).

En varios estudios se ha confirmado la relación entre la DMO y la resistencia del tejido óseo a fracturarse [Marshall D]. Otros determinantes de la resistencia ósea son el tamaño del hueso, la estructura macroscópica y microscópica, y la composición de las proteínas óseas.

Los resultados de la densitometría se ofrecen en forma de puntuaciones o escalas. Este procedimiento utiliza como unidad la desviación estándar y refiere el valor obtenido en el paciente con respecto a la variabilidad de esta variable en la población de referencia. Un Z-score es el número de desviaciones estándar por encima o por debajo del valor de DMO medio para individuos de la misma edad. Cuando el Z-score es 0, el paciente tiene un valor que coincide exactamente con el valor medio para su edad. En cambio, el T-score es el número de desviaciones estándar por debajo del valor medio de DMO para la población joven sana (adultos de entre 25 y 45 años). Un paciente con un T-score de 0 tiene una DMO exactamente igual al valor medio para los adultos jóvenes. Debido a que la DMO disminuye con la edad, el T-score es

más bajo que el Z-score a partir de los 40 años y esta diferencia aumenta con el envejecimiento [Guinot M].

La organización mundial de la salud (OMS) aprobó en 1994 los criterios densitométricos basados en la medida de la DMO en la columna lumbar, cadera o antebrazo, expresada en unidades de desviación estándar [WHO]. Los resultados se recogen en la siguiente tabla (Tabla 2):

<b>Categoría</b>	<b>Definición por densidad mineral ósea (DMO)</b>
Normal	Un valor de DMO mayor de -1 DE al valor medio del adulto joven
Osteopenia	Un valor de DMO de entre -1 y -2.5 DE al valor medio del adulto joven
Osteoporosis	Un valor de DMO menor de -2.5 DE al valor medio del adulto joven
Osteoporosis severa	Un valor de DMO menor de -2.5 DE al valor media del adulto joven, con presencia de una o más fracturas por fragilidad

**Tabla 2.** Categorías diagnósticas de la osteoporosis, basadas en el criterio de la OMS. DE: desviación estándar [WHO]

Recientemente, la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) ha publicado una guía de uso de la densitometría para el diagnóstico de la osteoporosis tanto en hombres como en mujeres [Lewiecki EM]. En ella se establecen nuevas indicaciones, entre ellas, se dice que la densitometría ósea está indicada tanto en mujeres mayores de 65 años o menores de esta edad

pero con riesgo de fractura, como en hombres mayores de 70 años o menores de esta edad pero con alto riesgo de fractura. También se recomienda usar el T-score tanto en mujeres como en hombres mayores de 50 años. El T-score está referido a individuos de su mismo sexo, y de edades comprendidas entre los 20 y 29 años (NHANES III database). En el caso de mujeres antes de la menopausia y hombres menores de 50 años, se debe usar, sin embargo el Z-score, que está referido a individuos del mismo sexo y de la misma edad. Es importante destacar que estas indicaciones aun no están validadas totalmente. Para la medición de la masa ósea se pueden utilizar un amplio número de técnicas. La mayoría se fundamenta en el uso de radiación ionizante: la absorciometría doble y simple de energía (DXA y SXA), la tomografía computerizada cuantitativa (TAC) y la absorciometría radiográfica. La densitometría tiene un amplio uso en clínica. Se usa como método predictivo del riesgo de fractura y para el diagnóstico de osteoporosis y del descenso excesivo de masa ósea (Tabla 2). También se utiliza para evaluar la respuesta del paciente a un determinado tratamiento (monitorización). Las regiones del esqueleto que se exploran fundamentalmente para la determinación de la DMO son el fémur proximal, que es el mejor indicador de riesgo de fractura de cadera, y la columna lumbar.

## 6.3. HISTOMORFOMETRÍA

### 6.3.1. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL

Para la obtención de muestras de calidad, el objetivo principal es preservar la fase mineral en el interior del hueso, para lo cual las muestras seleccionadas deben ser sometidas a un procedimiento que conduzca a evitar la desmineralización ósea.

La **fijación** se suele realizar con sustancias que no reaccionan con la fase mineral, como alcoholes a diferentes concentraciones (formol, etanol al 70% etc.).

Después de la fijación, la muestra debe ser **tallada**, es decir, debe ser sometida a unos cortes preliminares para obtener un fragmento adecuado para su estudio, o bien para crear una superficie, de manera que ayude a la hora de incluir la muestra en metacrilato, y quede bien orientada para posteriores cortes. Este proceso se suele realizar con sierras de precisión y requiere la **deshidratación** previa de la muestra pasándola por alcoholes de gradación creciente.

Una vez polimerizado el plástico (Glicol-, Metíl-, Polimetíl-Metacrilato) y tras cortes preparatorios en búsqueda de la superficie de la muestra, se procede al corte de los bloques con el **micrótopo**.

Cortar bloques de plástico relativamente duros y la manipulación de las secciones requiere cierta experiencia práctica sobre algunos principios básicos involucrados, las únicas variables que pueden ser controladas en el micrótopo son la velocidad de corte, el ángulo y el grosor de la sección. Es muy importante la calidad del micrótopo.

La **tinción** de las muestras es una parte fundamental en los estudios de muestras óseas sin decalcificar. La tinción es por tanto un paso importantísimo para poder desarrollar la histomorfometría y para la obtención de imágenes de calidad. El método más específico para detectar las matrices calcificadas es indudablemente la tinción de **von Kossa**, este tipo de tinción es el más apropiado para la demostración cualitativa de la presencia de la fase mineral. Los componentes del tejido calcificado se oscurecen en diferente medida desde el marrón claro al negro profundo, según su densidad mineral [Schenk RK et al].

Otras tinciones que se emplean son el **azul de toluidina** que permite observar, incluso en hueso mineralizado, si la estructura del hueso es laminar (hueso maduro) o plexiforme; y el **azul de metileno** que permite observar el reborde osteoide.

La **observación** y **digitalización** de las imágenes junto con el empleo de programas informáticos de análisis de imágenes nos ha proporcionado un gran número de parámetros estáticos por medida de estructuras teñidos, y dinámicos mediante el marcaje con tetraciclinas.

#### 6.3.2. MARCAJE CON TETRACICLINAS

Las tetraciclinas, administradas por vía oral o parenteral, tienen la capacidad de fijarse al mineral amorfo que se va aponiendo en los frentes de mineralización del hueso in vivo, pero no sobre los cristales de hidroxipatita [Serrano Figueras et al]. Esta característica, asociada a su capacidad de emitir fluorescencia cuando se observa al microscopio óptico cuando la muestra se ilumina con una longitud de onda determinada (360 nm), hace que su

administración antes de la realización de la histomorfometría tenga una utilidad en la evaluación dinámica del remodelado óseo. El fármaco se acumula en el plano donde se esté llevando a cabo la calcificación durante el tiempo que el mismo está presente en la circulación. La primera tanda de tetraciclinas se fija en el frente de mineralización; como resultado aparece en las zonas de formación ósea una banda fluorescente que marca la posición de dicho frente. A los 10-14 días, se administra otra tanda de tetraciclinas con la que se obtendrá una nueva banda fluorescente en el nuevo frente de mineralización. La separación entre ambas bandas y los días transcurridos entre la administración de las tetraciclinas proporciona información sobre la velocidad de desplazamiento del frente de mineralización, es decir, obtendremos información sobre el remodelado óseo.

#### **6.4. ESTUDIOS BIOMECÁNICOS**

La biomecánica es la ciencia que estudia la aplicación de las leyes de la mecánica a las estructuras y los órganos de los seres vivos, con el fin de describir su comportamiento y sus funciones.

Los huesos como elementos de una cadena cinemática (esqueleto), en distintas situaciones de la vida diaria, están sometidos a tensiones infligidas por diversas situaciones de carga que pueden producir su rotura. Este es el motivo por el que muchos investigadores se centran en conocer la resistencia del hueso ante dichas sollicitaciones.

Para conocer la resistencia de los huesos estos deben ser sometidos a ensayos mecánicos. Los ensayos mecánicos más comúnmente utilizados para evaluar las características mecánicas de los huesos de animales de laboratorio son los ensayos de flexión y torsión, para el estudio de los huesos largos, y los ensayos de compresión, para el estudio de vértebras espinales.

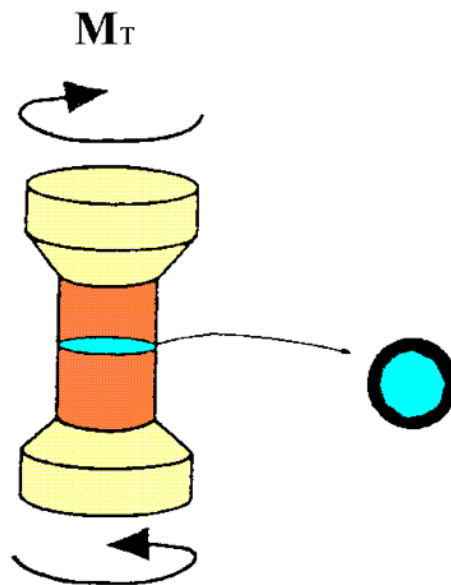
Es primordial, por tanto, conocer las características biomecánicas del hueso y la influencia que sobre éstas tiene la pérdida de masa ósea con el envejecimiento, así como las tensiones a las que es sometido con los distintos regímenes de cargas que se dan en la vida diaria, a fin de prevenirlas. Esto equivale a decir que es necesario conocer con detenimiento, las propiedades mecánicas del material del tejido óseo independientemente del hueso elegido, así como las propiedades estructurales que detenta como parte del esqueleto.

De entre todos los test, los ensayos biomecánicos de rotura son los que dan mayor información sobre las propiedades del hueso. Tienen en su contra, que son ensayos destructivos, y por tanto, sólo pueden ser utilizados con animales de laboratorio.

#### 6.4.1. ENSAYOS A TORSION

Estos ensayos se utilizan para medir las propiedades mecánicas del hueso a cortadura. Cuando se aplica un momento torsor a una probeta circular, la tensión cortante varía desde cero en el centro a un valor máximo en la superficie. La ecuación general que calcula la tensión cortante máxima es:

$$\tau = \frac{T}{J} \cdot r$$



**Fig. 7. Ensayos de torsión.**

donde  $\tau$  es la tensión cortante,  $M_T$  es el par torsor aplicado,  $r$  es el radio de la probeta, e  $I_0$  es el momento polar de inercia.

Los ensayos a torsión (Fig.7) se usan a menudo para calcular la resistencia de los huesos de los roedores. Antes de realizar los ensayos, las cabezas del hueso son empotradas en bloques de plásticos, o en un material con bajo punto de fusión para poder acoplarlas a las mordazas de la máquina.

El ensayo nos da la curva momento torsor-ángulo girado. La pendiente de la curva de la zona elástica nos da el módulo de deslizamiento o de elasticidad transversal cuyo valor es:



$$G = \frac{M_T}{\theta} * \frac{L}{K}$$

donde L es la longitud no empotrada del hueso, K es la constante de rigidez a la torsión y  $\theta$  es el ángulo girado por unidad de longitud. El valor de K para secciones transversales circulares es el momento polar de inercia  $I_0$  y es dificultoso de determinar por la irregularidad del hueso largo.

El método más exacto para medir el módulo de deslizamiento en los huesos es medir la deformación en la mitad del hueso utilizando galgas extensométricas

Los ensayos de torsión miden, como otros ensayos, tanto la rigidez intrínseca como la extrínseca. La rigidez intrínseca es el módulo de deslizamiento G y la extrínseca es la rigidez torsional  $G * I_0$ .

Los ensayos a torsión se realizan en máquinas especiales, las cuales deberán garantizar un adecuado centrado de la muestra, suavidad en el proceso de carga, ausencia de acciones flectoras y la posibilidad de medir con suficiente exactitud la magnitud del momento torsor. El posicionamiento de la pieza puede ser tanto horizontal como vertical y el momento torsor máximo es función de la capacidad y especificaciones de la máquina. Todas las máquinas están constituidas por un bastidor, un motor, por medio del cual gira la mordaza activa, un medidor de esfuerzos, un medidor de ángulos, un registrador gráfico o equipo informático de adquisición de datos, y un controlador de velocidad.

#### 6.4.2. CARACTERÍSTICAS BIOMECÁNICAS DEL HUESO

La mayor parte de las propiedades mecánicas de cualquier material se expresan en función de los esfuerzos internos que soportan.

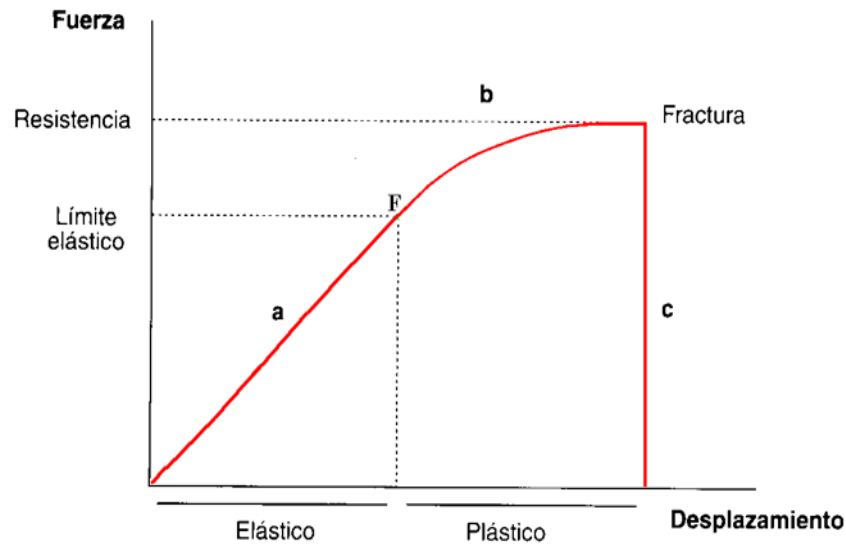
El concepto de tensión se introduce para valorar el efecto que una sollicitación produce sobre un cuerpo deformable y es independiente de sus dimensiones. Como es sabido se mide como la fuerza interna soportada por unidad de superficie.

En el caso más general, la tensión de un punto contenido en un plano, depende de la orientación del plano. El conjunto de tensiones que surgen en los diversos planos que pasan por el punto que se analiza, se denomina estado tensional en el punto.

Bajo la acción de las tensiones todos los materiales se deforman. Se llaman deformaciones elásticas a las que desaparecen una vez suprimidas las acciones exteriores a las que están sometidos los materiales, y deformaciones plásticas o residuales, las que se conservan después de cesar éstas, pero sin que se produzca la rotura. Generalmente las deformaciones se expresan en porcentajes relativos (cociente entre el alargamiento sufrido por la pieza y la longitud inicial, multiplicado por cien). El alargamiento y el acortamiento de un material se producen por la acción de las tensiones normales y las deformaciones angulares son originadas por las tensiones tangenciales.

La relación entre la tensión aplicada a la estructura y la deformación producida se expresa por medio de una curva llamada de tensión-deformación. Esta curva se puede dividir en dos regiones: una con deformaciones elásticas (no

permanentes) y otra con deformaciones plásticas (permanentes), como se ve en la Fig.8.



**Fig. 8. Curva de tensión-deformación.**

Sin embargo el hueso cortical, aún en la zona elástica, tiene una deformación permanente. Se debe a que la matriz del hueso tiene fluidos en su composición y durante la deformación éstos fluyen fuera de sus espacios intersticiales, produciéndose un fenómeno llamado viscoelasticidad que hace que se pierda parte de la energía elástica y por tanto la matriz del hueso no recupera su forma primitiva.

En el hueso cortical, la pendiente de la curva tensión-deformación en la zona elástica mide la rigidez intrínseca del material y es una constante del material que se llama módulo de elasticidad. Sin embargo si consideramos el hueso como parte del conjunto del esqueleto hay que referirse a la rigidez extrínseca que es la pendiente de la curva fuerza aplicada-deformación producida.

En el hueso esponjoso el valor de la rigidez es mucho más complejo de determinar ya que la rigidez intrínseca del material es la de cada trabécula y la rigidez estructural es la de la estructura trabecular que forman.

La ductilidad de un material se mide por la deformación permanente que soporta antes de la rotura. El hueso en general no es un material dúctil pues la zona plástica de la curva tensión-deformación es más pequeña que la zona elástica. El efecto opuesto es la fragilidad. Esto ocurre en enfermedades tales como la osteoporosis, comúnmente llamada enfermedad del hueso frágil.

Otra propiedad importante del hueso es la dureza, que mide la energía absorbida por el hueso antes de producirse la rotura. Esta propiedad se sabe que disminuye con la edad [Burnstein AH and Reilly DT et al]. En la curva tensión-deformación la energía absorbida se mide por el área de la curva delimitada entre la curva tensión-deformación y el eje de abscisas.

Otro punto interesante a estudiar en la curva tensión-deformación es el punto F, llamado punto de fluencia, que es el punto de separación entre la zona elástica del hueso y la zona plástica. En él, se inicia el daño permanente en el hueso.

Otro fenómeno importante que se produce en el hueso es la fatiga. Se debe al estado tensional del hueso cuando se le somete a cargas cíclicas inferiores a las alcanzadas en su límite elástico. Este fenómeno produce gradualmente la degradación del hueso a lo largo del tiempo debido a pequeñas grietas o microfracturas que dañan su estructura, originando una disminución del módulo de elasticidad y en el caso extremo su rotura [Turner CH et al].

## **7. DEFINICIÓN DE OSTEOPOROSIS**

Existe una definición de osteoporosis que podríamos calificar de oficial, acordada en la conferencia de consenso NIH celebrada en Hong-Kong en 1993, que la describe como una “enfermedad generalizada del esqueleto caracterizada por masa ósea baja y alteración de la microarquitectura del hueso, con aumento de la fragilidad del mismo y consecuente tendencia a las fracturas” [Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis, 1993]. En dicha definición se subrayan varios elementos, masa ósea baja, alteración de la microarquitectura, aumento de la fragilidad y tendencia a las fracturas.

La masa ósea baja (es decir, menor de la mecánicamente apropiada) y el trastorno de la microarquitectura son fenómenos interdependientes y se establecen simultáneamente. Hay trastorno de la microarquitectura porque se ha perdido hueso, y la pérdida de hueso se establece a expensas del adelgazamiento o la desaparición de los elementos estructurales del mismo (trabéculas, cortical). Lo más interesante de esta asociación es que justifica que el aumento de la fragilidad que acompaña a la pérdida de masa ósea sea desproporcionado para la misma. El proceso que subyace a ambos fenómenos es una alteración de la remodelación ósea. Podría, por ello, definirse la osteoporosis como una enfermedad de la remodelación ósea que determina una pérdida de masa ósea.

La osteoporosis es un proceso en sí mismo asintomático, que sólo tiene importancia médica por predisponer al desarrollo de fracturas. Esta

predisposición es lo que conocemos como fragilidad, que en consecuencia es, desde el punto de vista clínico, el fenómeno central de la osteoporosis. De hecho, en la conferencia de consenso NIH 2001 [World Health Organization Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis] se ha definido la osteoporosis simplemente como “una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea comprometida que aumenta el riesgo de fractura”. Es poco probable que esta definición llegue a desplazar a la previa, porque la disminución de la resistencia ósea no es exclusiva de la osteoporosis pero en cualquier caso, supone un cambio del centro de atención de la enfermedad hacia la fragilidad ósea.

Es habitual afirmar que la masa ósea (que, como ya se ha dicho, está en íntima relación con la microarquitectura) baja, es el mejor índice de predisposición a la fractura, de hecho ha sido el criterio elegido por la OMS para diagnosticar la osteoporosis. Y, sin embargo, la relación entre masa ósea y fracturas es relativamente pobre. Ello nos obliga a pensar que en la fragilidad están implicados más factores que la masa ósea. En definitiva, nos obliga a plantear el concepto de calidad ósea.

La calidad ósea es un concepto impreciso, en el que se ha pretendido incluir todo aquello que, siendo ajeno a la masa ósea, condiciona la fragilidad del hueso. En un sentido más apropiado, debería guardar relación fundamentalmente con las características del tejido óseo: propiedades del colágeno, situación de la mineralización del osteoide, acúmulo de líneas de cementación, presencia de lesiones de fatiga, incluso podría abarcar aspectos como la viabilidad de los osteocitos. Algunas veces se incluye en el concepto de calidad ósea la microarquitectura.

## 8. TIPOS DE OSTEOPOROSIS

La osteoporosis puede clasificarse siguiendo múltiples criterios:

1. Según su extensión: generalizada o localizada.
2. Según la edad de comienzo: juvenil, adulto joven y senil.
3. Según su etiología: idiopática o primaria y secundaria (tabla 3)

<b>Osteoporosis idiopática o primaria:</b>
Juvenil.
Adulta. <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Tipo I de Riggs</i></li><li>• <i>Tipo II de Riggs.</i></li></ul>
<b>Osteoporosis secundaria:</b>
Digestivas: <i>hepatopatía, alcoholismo, gastrectomía, malabsorción.</i>
Endocrinopatías: <i>Hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, déficit hormonal, acromegalia, hipercortisolismo.</i>
Metabolopatías y Nefropatías: <i>diabetes mellitus, acidosis.</i>
Alimentarias: <i>ingesta baja en calcio, déficit de vitamina D, dieta hiperproteica.</i>
Genéticas: <i>síndrome de Turner, Klinefelter y Marfán, osteogénesis imperfecta.</i>
Hematológicas: <i>mieloma, leucemia, macroglobulinemia.</i>
Farmacológicas: <i>esteroides, heparina, barbitúricos, diuréticos, citostáticos.</i>
Otros: <i>inmovilidad, artritis reumatoide, etc.</i>

**Tabla 3. Clasificación de la osteoporosis generalizada**

Cuando la osteoporosis se produce como consecuencia de otra patología se denomina osteoporosis secundaria, y puede estar asociada con una larga lista de enfermedades como el hipogonadismo, hipertiroidismo, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo, hipercortisolismo, alcoholismo , etc. [Melton LG and Rigs BL et al].

La osteoporosis primaria o idiopática se suele dividir en dos grupos, la osteoporosis idiopática juvenil y la del adulto.

La osteoporosis idiopática juvenil, es menos frecuente y por lo general afecta a niños hasta que alcanzan la adolescencia, remitiendo después de forma espontánea. Clínicamente se manifiesta por aplastamientos vertebrales múltiples.

La osteoporosis idiopática del adulto es la forma más habitual, iniciándose en la edad media de la vida y haciéndose más frecuente a mayor edad. Riggs y Melton caracterizaron dos tipos fundamentales de osteoporosis del adulto (Tabla 4):

Osteoporosis tipo I: también llamada de alto remodelado, afecta fundamentalmente a mujeres entre 5 y 20 años después de la menopausia. Aunque con menor frecuencia, la relación mujer/varón es de 6/1, los varones presentan una forma de osteoporosis, que no se puede distinguir de la que se observa en las mujeres posmenopáusicas. Suelen tener pérdida de hueso trabecular tres veces superior a las pérdidas ocasionadas en personas normales. La predilección por el sexo femenino y la asociación de esta enfermedad con edades posmenopáusicas implican un déficit estrogénico como agente etiológico de la enfermedad. Se relaciona con una mayor resorción ósea debida al incremento de la actividad osteoclástica como



consecuencia del déficit estrogénico. No obstante el hecho de que todas las mujeres en este periodo de vida presenten privación hormonal ocasionada por la insuficiencia ovárica y que sólo una parte de ellas presenten la enfermedad indica que alguno o varios factores además de la menopausia determina la susceptibilidad individual a la enfermedad.

Osteoporosis tipo II: conocida también como osteoporosis de bajo remodelado, aparece en varones y mujeres de más de 75 años de edad. Se caracteriza por pérdidas proporcionales de hueso cortical y trabecular. En su fisiopatología aparecen implicados un déficit funcional del osteoblasto por envejecimiento celular y alteraciones del metabolismo de la vitamina D que conllevan a una disminución de la absorción intestinal de calcio e hiperparatiroidismo secundario.

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>
<b>Edad</b>	50-65 años	> 75
<b>Mujer/Varón</b>	6	1
<b>Pérdida de hueso</b>	Trabecular Acelerada	Trabecular y cortical No acelerada
<b>Tipo de fractura</b>	Vertebral	Vertebral y cadera
<b>Niveles de PTH</b>	Disminuidos	Aumentados
<b>Absorción de calcio</b>	Disminuida	Disminuida
<b>Vitamina D</b>	Reducida	Reducida
<b>Etiología</b>	Déficit estrogénico	Envejecimiento celular, hipovitaminosis D

**Tabla 4. Clasificación de Riggs de la osteoporosis.**

## **9. LA OSTEOPOROSIS DEL VARÓN**

### **9.1. DEFINICIÓN DE LA OSTEOPOROSIS DEL VARÓN**

En el varón, sigue siendo válida la definición de consenso de Hong-Kong 1993 ya mencionada anteriormente.

Aunque varios autores [Orwol ES et al, Seeman E] han aconsejado para aceptar el diagnóstico de osteoporosis en el varón, una mayor pérdida de masa ósea que en mujeres posmenopáusicas definida por densitometría de doble fotón (DEXA), estudios posteriores [Blanch J et al] observaron que el umbral densitométrico era similar en ambos sexos y la mayoría de los estudios publicados en los últimos años usan los criterios del panel de expertos patrocinados por la OMS para el diagnóstico de osteoporosis en el varón. No existe, pues, una definición operativa (diagnostica) de la osteoporosis masculina; a falta de ella se han propuesto fundamentalmente dos tipos de criterios. El primero de ellos defiende utilizar como punto de referencia el mismo valor absoluto de masa ósea que para la mujer (media juvenil femenina menos 2.5 DE), el segundo considera que es la media juvenil masculina menos 2.5 DE el valor que debe constituir el punto de referencia. Dado que este último es más alto que el femenino, deja por debajo un número mayor de personas, y por tanto clasifica un mayor número de varones como enfermos. El segundo criterio parece estar más acorde con el numero de varones que acaba padeciendo fractura osteoporótica, por lo que se tiende a considerar preferible.

Existen dos razones para que haya diferencias cuantitativas entre hombres y mujeres. La primera, el hecho de que al finalizar el desarrollo, el varón posee una masa ósea mayor (en un 25% - 30%) que la de la mujer. Debe precisarse que esta mayor masa ósea, cuando se divide por el mayor volumen del esqueleto masculino, proporciona una densidad similar. Cuando la masa ósea no se refiere al volumen, sino al área como ocurre con los resultados proporcionados por la DXA, se obtiene en el varón un valor un 10-15% superior. En todo caso, al ser mayor el tamaño del esqueleto masculino, su resistencia también es mayor. La segunda razón de que existan diferencias cuantitativas entre ambos sexos es la de que el hombre no experimenta un fenómeno equivalente al de la menopausia que, por la brusca depleción hormonal que supone, determina una pérdida ósea acelerada en la mujer.

Las diferencias cualitativas tienen que ver con las diferencias en el recambio y modelación óseas entre ambos sexos. [Schapira D et al].

## **9.2. CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS DEL VARÓN**

Al no existir un equivalente masculino de la menopausia, la división clásica de la osteoporosis es inaplicable en el varón, siendo de mayor utilidad una clasificación que engloba la etiológica y el estado metabólico óseo (Tabla 5) [Ciria M and Blanch J].

<b>Osteoporosis masculina idiopática</b>
Normocalciúria (Recambio óseo normal-bajo).
Hipercalciúria (Recambio óseo elevado).

<b>Osteoporosis masculina secundaria</b>
<p>Secundaria a hepatopatía crónica y/o enolismo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No asociada a hiperparatiroidismo (Recambio óseo normal-bajo).</li> <li>• Asociada a hiperparatiroidismo (Recambio óseo elevado).</li> </ul> <p>Secundaria a ingesta de corticoides</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingesta previa de corticoides. (Recambio óseo normal-bajo).</li> <li>• Ingesta actual de corticoides (Recambio óseo elevado).</li> </ul> <p>Secundaria a hipogonadismo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Déficit crónico de andrógenos/estrógenos. (Recambio óseo normal-bajo).</li> <li>• Déficit agudo de andrógenos/estrógenos (Recambio óseo elevado).</li> </ul> <p>Secundaria a malabsorción</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Malabsorción crónica (Recambio óseo normal-bajo).</li> <li>• Asociado a hiperparatiroidismo (Recambio óseo elevado).</li> </ul> <p>Secundaria a otros procesos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recambio óseo normal-bajo</li> <li>• Recambio óseo elevado</li> </ul>

**Tabla 5. Clasificación de la osteoporosis del varón.**

### **9.3. HIPOGONADISMO MASCULINO Y OSTEOPOROSIS**

Las acciones biológicas de una hormona se confirman al constatar los trastornos que se observan en las enfermedades ocasionadas, bien por déficit o bien por exceso de su producción. Así, una de las evidencias más sólidas a favor del papel de los andrógenos en el metabolismo óseo ha sido constatar lo que ocurre en pacientes que padecen un déficit androgénico. Actualmente es bien conocido que el hipogonadismo masculino, ya sea de origen hipotálamo-hipofisario como de origen testicular, es una causa evidente de osteoporosis secundaria [Jackson JA and Kleerekoper].

El déficit de testosterona constituye un riesgo claro de fracturas en el varón [Jackson JA Rigs W et al]. Este descenso de masa ósea producido por depleción androgénica está bien establecido tanto en humanos [Turbí C] como en animales de experimentación [Erben RG et al, Vanderschueren D et al].

Lea evidenció, en ratas hembra, que los andrógenos llevan a cabo su efecto protector sobre el hueso directamente y no por conversión periférica a estradiol.

#### **9.4. FUNCIÓN GONADAL MASCULINA Y ENVEJECIMIENTO**

La situación clínica más comúnmente relacionada con la osteoporosis femenina es la menopausia, condicionada fundamentalmente por el déficit gonadal adquirido por fallo ovárico secundario [Gambert SR et al]. Por analogía, sería en cierta forma lógico considerar que en el sexo masculino ocurre un proceso equivalente. No obstante, actualmente no se conoce con exactitud la fisiopatología de la función gonadal masculina en relación al

envejecimiento [Tsitouras PD et al]. Es evidente que el varón no desarrolla fallo testicular agudo, con hipogonadismo hipogonadotrofo (andropausia o climaterio masculino), entre la quinta y sexta década de la vida como ocurre en la mujer. Por otra parte también es obvio que la función gonadal disminuye en cierto grado en la vejez.

La mayoría de los estudios en varones detectan valores de testosterona total o libre normales o disminuidos, junto con un aumento de los de LH, lo que es compatible con un defecto funcional de las células de Leydig relacionado con el envejecimiento. Por otra parte la administración de hCG como estímulo exógeno para las células de Leydig consigue aumentar la secreción de testosterona, lo que sugiere una respuesta inadecuada al fallo testicular parcial [Gray A et al].

A modo de resumen, en relación a la función gonadal masculina y el envejecimiento podemos decir que en todo caso no se produce universalmente un fallo gonadal absoluto, sino un descenso leve y progresivo de testosterona, probablemente atribuible a un mecanismo mixto, tanto de fallo a nivel hipotálamo-hipofisario como testicular [Simon D et al].

## **9.5. TERAPIA ANDROGÉNICA Y METABOLISMO ÓSEO**

En el área de la terapéutica, dado que el hipogonadismo masculino condiciona osteoporosis, es incesante, desde el punto de vista fisiopatológico, observar los efectos del tratamiento sustitutivo del hipogonadismo sobre el metabolismo óseo. En general, todos los parámetros alterados mejoran con el tratamiento

con testosterona, y esto ha sido demostrado ampliamente [Filkenstein J et al]. No obstante este tratamiento no consigue normalizar absolutamente el metabolismo óseo, pese a mantener valores hormonales androgénicos normales. Sin embargo, aumentando la dosis sustitutiva sí se consigue mejorar dicho metabolismo óseo [Guo CY et al]. Otro aspecto diferente es considerar los efectos sobre el tejido óseo del tratamiento con andrógenos en varones de edad avanzada, ya sea en estados de función hormonal normal para su edad, sin hipogonadismo clínicamente manifiesto. Algunos estudios han demostrado un posible beneficio de estos tratamientos [Tenover J et al]. En todo caso, y exceptuando los estados de hipogonadismo masculino, las indicaciones admitidas del tratamiento con andrógenos no incluyen la osteoporosis masculina [Bagatell CI].

## **9.6. PREVALENCIA DE LA OSTEOPOROSIS DEL VARÓN**

En España disponemos de un estudio poblacional que nos permite una estimación de la prevalencia de la osteoporosis del varón en base a mediciones densitométricas [Díaz Curiel M]. Según este, alcanza el 4,15%, lo que representa unos 750.000 varones.

Se ha calculado que el 30% de las fracturas de cadera que ocurren en el mundo corresponden a varones, extrapolándose que en el año 2025, las fracturas de cadera en el varón alcanzarán la cifra de 1,16 millones [Cooper G et al] Por otro lado un estudio europeo ha comprobado que la prevalencia de

deformidades vertebrales es similar en hombre que en mujeres [Agnusdei D et al].

La enfermedad golpea más a mujeres, pero también los hombres la padecen en proporción apreciable. En efecto, cuatro de cada 10 mujeres de 50 años acabará padeciendo una de las tres fracturas osteoporóticas mayores. Pero también la padecerán un 13% de varones de esta edad. Si tenemos en cuenta que la osteoporosis es una enfermedad crónica, ligada al envejecimiento, y que el número de personas de edad avanzada aumenta rápidamente, es fácil adivinar que la enfermedad aumentará de forma paralela al envejecimiento de la población.

**En vista a estos datos, podemos afirmar que el problema de la osteoporosis en el varón dista mucho de ser un tema que podamos tratar de manera superficial. Pocos procesos acaban teniendo un riesgo acumulado tan elevado.**

## **10. PERSPECTIVAS DEL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ACTUAL**

En la actualidad, existen muchas opciones terapéuticas y tratamientos farmacológicos que actúan reduciendo el riesgo de fractura. Es importante que la elección del tratamiento se ajuste a las necesidades médicas y al estilo de vida específico de cada paciente.



Los diferentes fármacos utilizados para combatir la OP se pueden clasificar en dos grupos principales, de acuerdo con su mecanismo de acción: los inhibidores de la resorción ósea o antirresortivos y los estimuladores de la formación ósea u osteoformadores. También se ha descrito un tercer tipo de fármacos que presentan acciones duales, consistentes en que pueden activar la formación ósea (aunque menos intensamente que los osteoformadores) y además inhiben la resorción, bloqueando la actividad osteoclástica. Esta última clase terapéutica tiene un único representante comercializado, el ranelato de estroncio. Este fármaco, debido a su mayor actividad antirresortiva (demostrada por su efecto sobre los marcadores de remodelado óseo) y sus indicaciones terapéuticas, se asemeja a los bifosfonatos. En la Tabla 6 se resumen los tratamientos empleados en la actualidad.

Grupo	Fármaco	Características
Inhibidores de resorción (Antiresortivos)	Calcitonina	Inhibe la actividad osteoclástica
	SERMs (moduladores del receptor estrogénico): <i>Raloxifeno, Lasofoxifeno</i>	Tienen efectos tejido específico: son agonistas de los estrógenos en hueso y antagonistas en mama
	Bifosfonatos: <i>Risedronato, Alendronato, Ibandronato, Zoledrónico</i>	Compuestos análogos a los pirofosfatos inorgánicos, inhiben la acción de los osteoclastos evitando la unión de éstos a la superficie ósea
	Denosumab	Actúa uniéndose al RANKL e impide su activación, inhibiendo la formación de osteoclastos
Osteoformadores	Teriparatida y PTH (1-84)	Son agentes anabólicos, que estimulan la formación de hueso cuando se administran de forma intermitente
Mecanismo dual	Ranelato de estroncio	Disminuye la diferenciación osteoclástica, aumentando la actividad osteoblástica y la síntesis de colágeno

Tabla 6. Tratamientos para la Osteoporosis aprobados actualmente en España

Los efectos de PTH en el crecimiento y la resorción ósea son paradójicos y complejos. Los niveles elevados de manera constante de la hormona ocasionan disminución de la DMO y elevación de la calcemia. Sin embargo, cuando se administran inyecciones una vez al día, el resultado es un aumento de la DMO. En el año 1929, Bauer, Aub y Albright observaron que la administración de PTH incrementaba el número de trabéculas óseas, observación confirmada por Selye tres años después. Los estudios clínicos en pacientes han demostrado que inyecciones diarias de 14,8 a 100 µg de PTH (1-34) (teriparatida) o PTH (1-84) entre 1 y 3 años, asociadas a la administración de vitamina D y calcio por vía oral, aumentan la DMO vertebral entre un 6,9% y un 32%, siendo sin embargo menos capaces de incrementar la DMO en el antebrazo, la cadera o la muñeca, ocurriendo incluso una disminución de la DMO en estas localizaciones [Diaz Martín MA et al, Robert L et al]. Sin embargo, y este es el efecto paradójico de la hormona, incluso aunque la PTH sea administrada una vez al día o se reciba en infusión por un tiempo no superior a una hora, PTH es capaz de aumentar el ratio de expresión génica RANKL/OPG en las células del estroma de la médula ósea, con lo que también estimula la generación de osteoclastos, y por tanto un aumento de la resorción ósea [De la Piedra C and Traba ML et al]. Por ese motivo, una exposición prolongada a PTH ocasionará una pérdida neta de masa ósea [Schenk RK et al]. La PTH ha sido aprobada por la FDA para su uso en mujeres y hombres con riesgo de fractura elevado, incluyendo aquellos con fractura osteoporótica previa, la presencia de múltiples fracturas de riesgo o fracaso de otros tratamientos. El tratamiento debe ser reservado a pacientes con alto riesgo debido a la necesidad de una inyección diaria, el alto coste y la

posibilidad del riesgo de osteosarcoma (observado en ratas que recibieron altas dosis). En julio de 1997 se presentó a la FDA un estudio en varones, el GHAJ, en el se incluyeron 437 hombres con osteoporosis idiopática o hipogonadal. Los resultados obtenidos dicen que con una dosis de 20µg se produce un aumento de la densidad mineral ósea en columna y cuello femoral sin efecto significativo en cadera total. Existe un incremento de la masa ósea total del cuerpo. Los ensayos clínicos concluyen que la PTH es un tratamiento efectivo y seguro para la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas y hombres produciéndose una mejora en la microarquitectura ósea y un aumento de masa ósea, previniendo las fracturas vertebrales y no vertebrales.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

## **HIPÓTESIS**

Si la depleción androgénica ocasiona disminución de la cantidad y calidad ósea con el consiguiente aumento del riesgo de fractura y la administración intermitente de PTH ha demostrado tener un efecto anabólico aumentando la cantidad de masa ósea, su administración siguiendo esta misma pauta podría mejorar también la calidad del hueso mejorando propiedades como la geometría, la microarquitectura, la conectividad trabecular, la capacidad de reparación de microfracturas, las propiedades físicas del material óseo y la composición química de la matriz.

# OBJETIVOS

OBJETIVOS de este trabajo han sido:

1. Estudio de los efectos producidos por la falta de andrógenos sobre el hueso en un modelo experimental de rata orquidectomizada adulta.
  - a. Estudio comparativo con trabajos previos sobre los efectos de la castración sobre la densidad de masa ósea, estructura trabecular y remodelado óseo estudiado a través de marcadores de formación y resorción ósea.
  - b. Estudio de los cambios morfológicos producidos por la falta de andrógenos a nivel de morfología y geometría de las vértebras y diáfisis.
  - c. Estudio de las modificaciones producidas por la castración en el grado de remodelado óseo medida histomorfométricamente mediante el marcaje con tetraciclinas.
  - d. Estudio de las modificaciones en la mineralización producidas por la orquidectomía.
  - e. Comparación de las propiedades biomecánicas del hueso de rata orquidectomizada y la rata control.
2. Analizar cómo afecta a la calidad ósea, medida a través de los parámetros anteriores, el tratamiento intermitente con PTH (1-34) de rata a animales con osteoporosis debida a la falta de andrógenos, tanto a nivel preventivo como curativo.

# III. MATERIAL Y MÉTODO

---



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

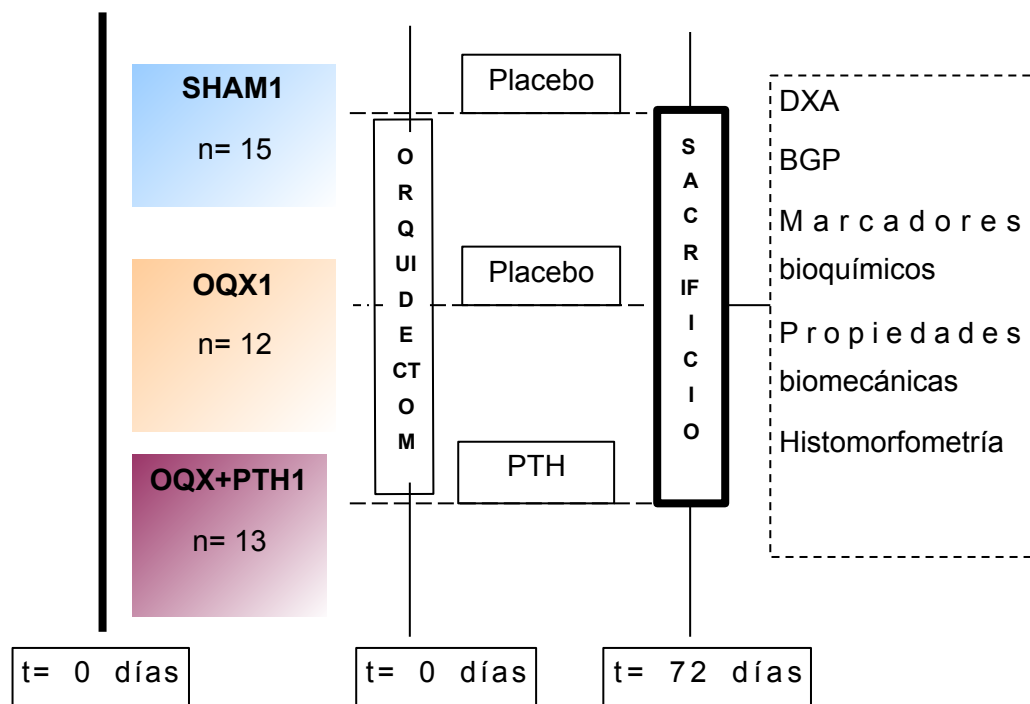
Se estudiaron 97 ratas Wistar macho (M) de 9 meses de edad y un peso medio de  $523 \pm 74$  g, que permanecieron en unas condiciones de temperatura estable a 22 grados centígrados, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y acceso libre a comida y agua (figura 9). La dieta suministrada (Rodent r-Diet) contenía 16,2% de proteínas, 2,8% de lípidos, 70,9% de hidratos de carbono, 3,5% de celulosa, 0,55% de fósforo, 0,75% de calcio y 5,3% de cenizas, además de los siguientes suplementos: Vitamina A (18.000 UI/Kg.), Vitamina D3 (1.800 UI/Kg.) y vitamina E (24mg./Kg.).



Fig. 9: Jaula de animalario.

Las ratas fueron operadas de forma simulada (SHAM) u orquidectomizadas (OQX) y se repartieron en 2 estudios:

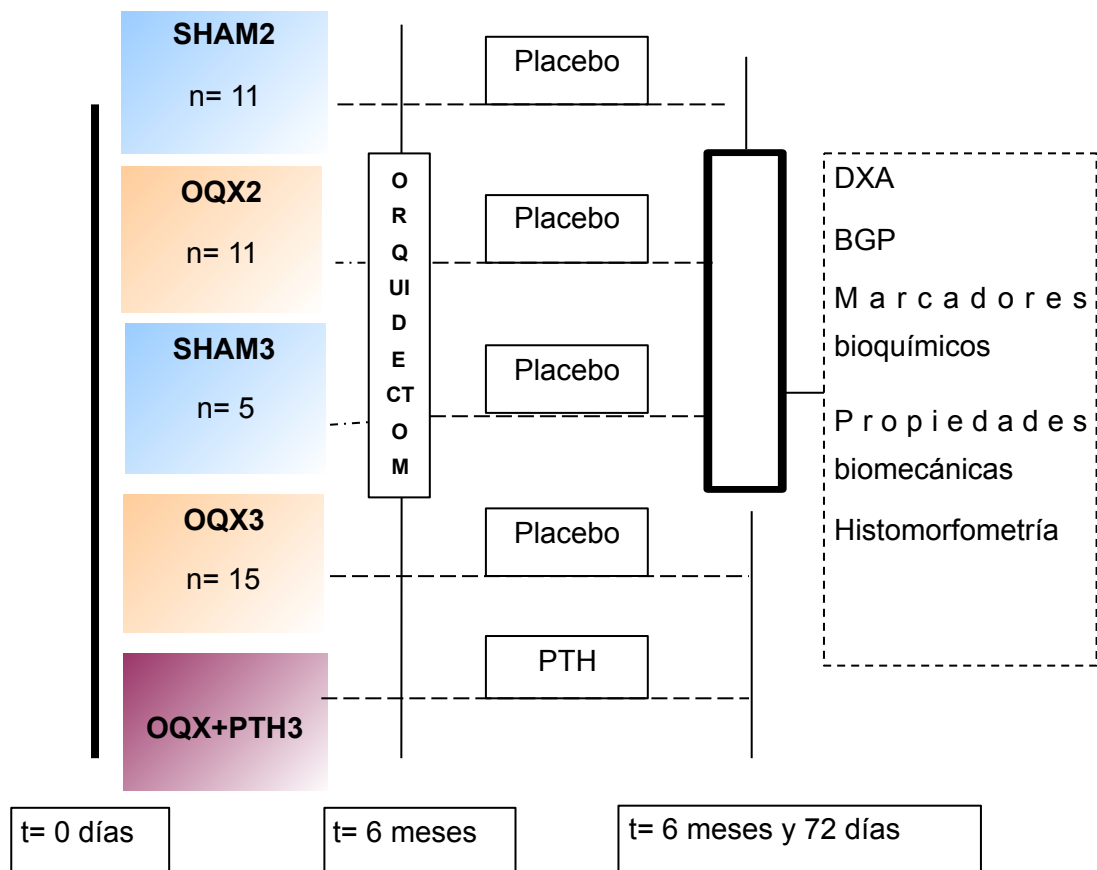
1. Estudio A (Figura 10): Prevención de la osteopenia inducida por depleción hormonal. Formado por tres grupos:
  - a. Ratas tratadas con placebo durante 72 días (SHAM n=15);
  - b. Ratas castradas tratadas con placebo durante 72 días (OQX n=12)
  - c. Ratas castradas y tratadas inmediatamente después de la operación con PTH durante 72 días (OQX+PTH n=13).



**Fig.10: Estudio A.** Prevención de la osteopenia inducida por depleción androgénica.

2. Estudio B: Tratamiento de la osteopenia establecida. Se establecieron 5 grupos (Figura 11).

- Ratas SHAM sacrificadas 6 meses después de la operación simulada (SHAM1 n=11),
- Ratas sacrificadas 6 meses después de la orquidectomía (OQX1 n=11)
- Ratas SHAM tratadas con placebo durante 72 días comenzando 6 meses después de la operación simulada (SHAM2 n=5),
- Ratas operadas tratadas con placebo durante 72 días comenzando 6 meses después de la castración (OQX2 n=15)
- Ratas operadas y tratadas con PTH durante 72 días comenzando el tratamiento 6 meses después de la castración (OQX2+PTH n=15).



**Fig. 11: Estudio B.** Tratamiento de la osteopenia establecida.

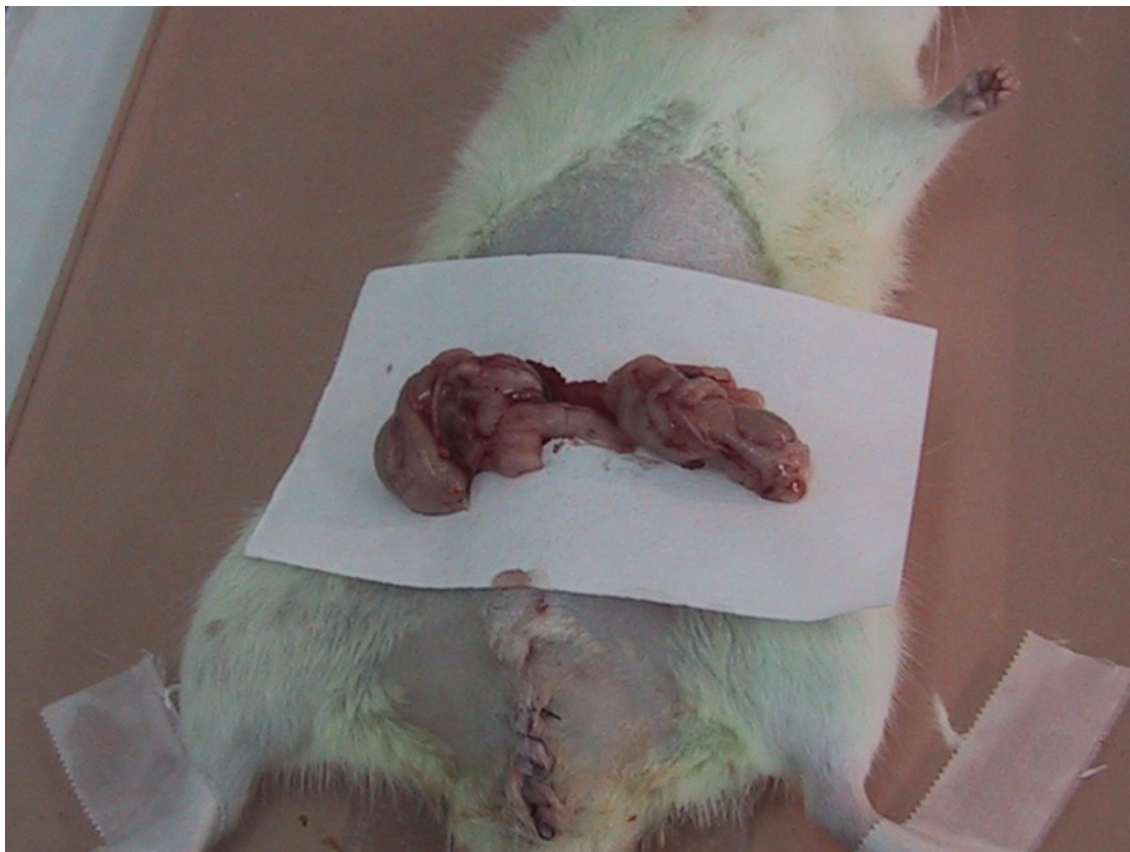
En la Tabla 7 se resumen los grupos de estudio

Ratas macho		Edad	Dosis PTH	Duración	Edad final (meses)
Estatus	n	inicial (meses)	(g/Kg/día)	(días)	
<b>Estudio A: prevención de la osteopenia inducida por depleción hormonal</b>					
SHAM1	15	9	0.0	72	11,5
OQX1	12	9	0.0	72	11,5
OQX+PTH1	13	9	4x10 <sup>-6</sup>	72	11,5
<b>Estudio B: tratamiento de la osteopenia establecida</b>					
SHAM2	11	9	0.0		15
OQX2	11	9	0.0		15
SHAM3	5	9	0.0	72	17,5
OQX3	15	9	0.0	72	17,5
OQX+PTH3	15	9	4x10 <sup>-6</sup>	72	17,5

**Tabla 7. Grupos de estudio.**

### 3.2. ORQUIDECTOMÍA

Bajo anestesia por vía intramuscular y con la rata colocada en decúbito supino se realizó una incisión escrotal, previo rasurado de la zona, se localizaron los testículos, se separaron del tejido adiposo adyacente y se ligaron los conductos y arterias testiculares, procediéndose entonces a la extirpación de ambos testículos (Figura 12).



**Fig. 12: Detalle de rata macho tras la orquidectomía.**

En las ratas con operación simulada (SHAM) se procedió exactamente igual exceptuando la ligadura de los conductos y arterias testiculares y sin extirpar los testículos.

Para la anestesia de los animales se utilizó una mezcla de clorhidrato de xilacina al 2% (Rompun®) y ketamina 50 mg./ml. (Ketolar®) en una proporción 1:2, administrada por vía intramuscular. La xilacina es un derivado de la tiazina con propiedades sedantes, analgésicas y relajantes de la musculatura esquelética; es un potente agonista de los receptores alfa-2 adrenérgico que se usa ampliamente como especialidad veterinaria. La ketamina es un anestésico general de acción rápida con anestesia profunda y conservación del reflejo

faríngo-laríngeo y estímulo cardiorrespiratorio; es una especialidad de uso hospitalario.

En este trabajo, dado que la dosis de estos fármacos dependen del peso del animal, se emplearon 200 µl. de Rompun® y 400 µl. de Ketolar® por rata.

### **3.3. PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA PTH**

Para la administración de la PTH, se utilizó el fragmento 1-34 de la PTH de rata (SIGMA-ALDRICH, Germany) a una dosis de 4 µg./Kg./día. Ésta se diluyó en una solución de ácido acético glacial y albúmina al 0,1% en agua, se alicuotó y se procedió a su liofilización y se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso. El día de su utilización, la PTH se disolvió en suero fisiológico al 0,9% y se administró diariamente a las ratas por vía subcutánea durante 72 días inmediatamente después de la operación en el caso del estudio A, y 6 meses después de la operación en el caso del estudio B (Figura 13).



**Fig. 13: Detalle de administración de PTH.**



Como placebo se utilizó suero salino fisiológico al 0,9%.

### **3.4. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS**

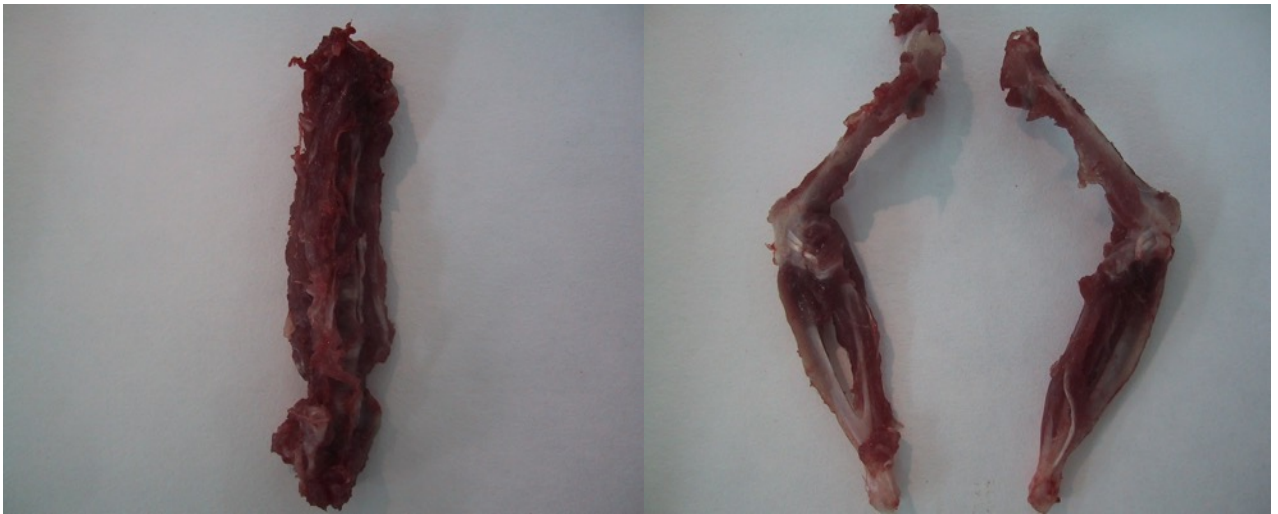
Un día después del último día de tratamiento, tras pesar las ratas, se procedió al sacrificio de las mismas bajo anestesia con éter mediante exanguinación por punción cardiaca (Figura 14).



**Fig. 14: Detalle de la exanguinación por punción cardiaca**

La sangre obtenida en el sacrificio de los animales fue centrifugada a 2500 r.p.m. durante 15 minutos para la obtención de sueros. Estos sueros fueron alicuotados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en la determinación de marcadores de remodelado óseo y parámetros bioquímicos.

Después de la determinación in situ de la densitometría ósea en la columna, se procedió también a la extracción y lavado de las partes blandas de las dos tibias, fémur izquierdo y de la vértebra L4 de las ratas para su posterior uso en los estudios histomorfométricos (Figuras 15 y 16).



**Fig. 15: Detalle de la columna lumbar y de las dos tibias de las ratas tras su extracción.**



**Fig. 16. Detalle de los dos fémures de la rata una vez limpios.**



Las ratas fueron después congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día anterior a la realización de las densitometrías óseas momento en el cual se descongelaron, manteniéndose en nevera a  $4^{\circ}\text{C}$ . Cuando los animales estuvieron descongelados se procedió a la extracción del fémur izquierdo y a la realización posterior de la determinación de la masa ósea en dicho fémur. También se extrajo en ese momento el fémur derecho para la posterior determinación de las propiedades biomecánicas del hueso. Este fémur derecho fue limpiado de tejidos blandos y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  envuelto en una gasa impregnada en suero salino al 0,9% para evitar una excesiva desecación del mismo.

A continuación, se determinó la densidad mineral ósea en columna lumbar “in situ”.

### **3.5. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA**

La determinación de la masa ósea se realizó mediante absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA) con tecnología HOLOGIC® QDR-1000/W™. El densitómetro es de primera generación y está basado en tecnología pencil-beam (Hologic Inc. Waltham, MA, USA).

Este densitómetro se utiliza para la densitometría ósea en humanos, así que para su utilización en huesos de pequeño tamaño fue necesario añadir un colimador de rayos de 1 mm [Gala Paniagua J] (Figura 17). Además, las densitometrías se analizaron con un programa informático para el análisis con



**Fig. 17: Densitómetro.**

alta resolución, que permite incrementar el número de líneas escaneadas (espacio por línea de barrido de 0.0254 cm), y el número de puntos de resolución (resolución de cada punto de 0.0217 cm). Los coeficientes de variación de esta técnica son de 0.53 – 1.2 % .

Las densitometrías se realizaron a nivel de columna lumbar, en las vértebras L2, L3 y L4, y en todo el fémur izquierdo tras su extracción, aunque se distinguieron tres zonas:

L1: Espíffisis proximal o cabeza del fémur.

L2: Diáfisis

L3: Epíffisis distal

Se calculó la DMO total, que resultaba de la media de los valores de las tres zonas analizadas en cada región.

El densitómetro se calibraba diariamente con el objeto de mantener unas óptimas condiciones de reproducibilidad y calidad en la medida, siempre dentro del rango de los valores recomendados por el fabricante.

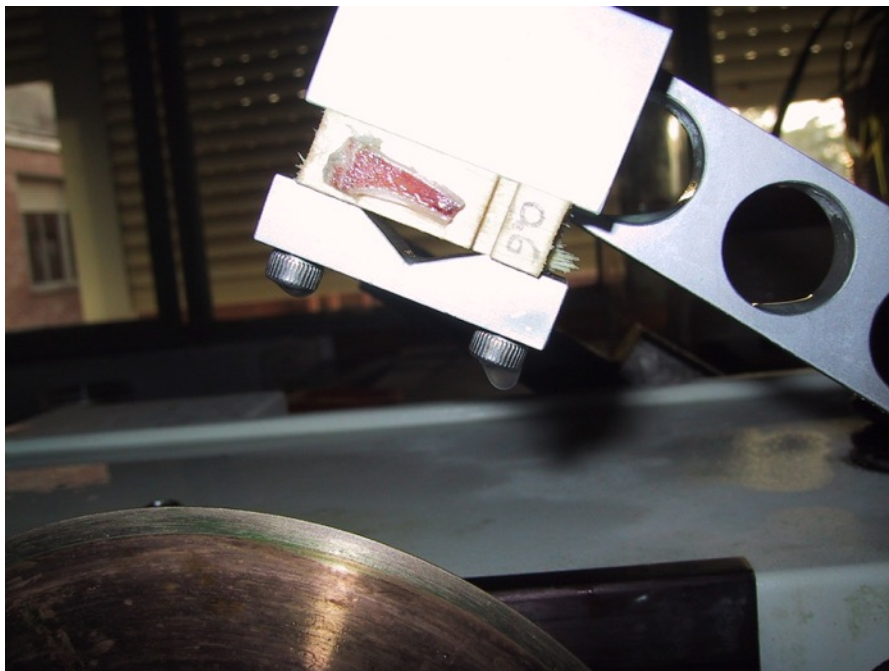
La reproducibilidad de las mediciones in vitro fue testada mediante un fantoma antropomórfico de composición mineral conocida (s/n Q-239, Hologic ®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El coeficiente de variación in vitro durante el período de estudio fue de 0.58% para la DMO y 0.60% para el CMO.

### **3.6. ESTUDIOS HISTOMORFOMÉTRICOS**

El primer paso para la realización del estudio histomorfométrico fué la fijación de las tibias y vertebras lumbares en disolución de formol tamponado al 10%, donde estuvieron incluidas durante 10 horas a 4° C.

#### **3.6.1. MÉTODO PARA EVALUAR LA MICROARQUITECTURA 3D Y LA CANTIDAD APARENTE DE HUESO TRABECULAR EN MM2**

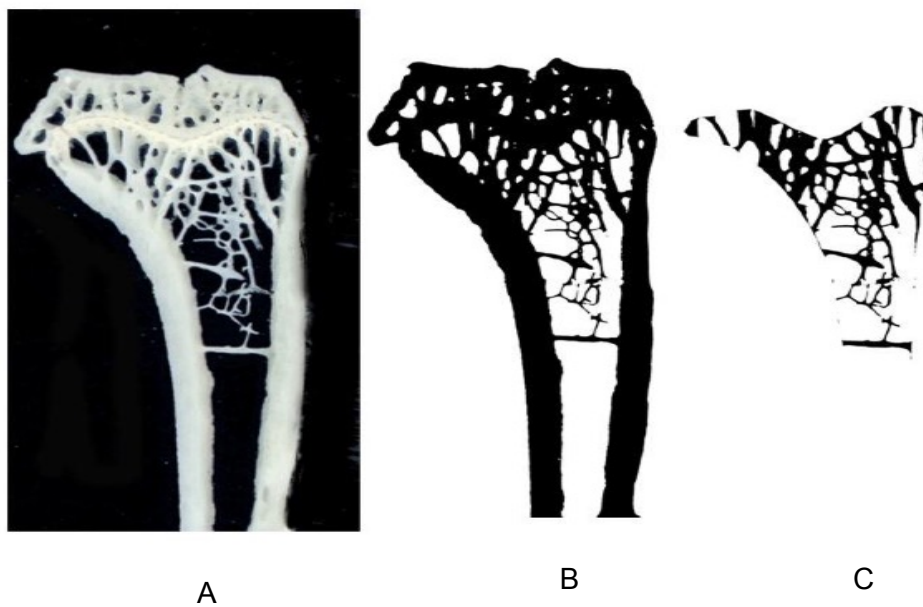
Tras la fijación se procedió al tallado de las tibias izquierdas con una sierra circular de precisión lineal Isomet 1000 (Figura 18), obteniéndose cortes de 500 µm de grosor. A continuación se hicieron anorgánicas con hipoclorito sódico.



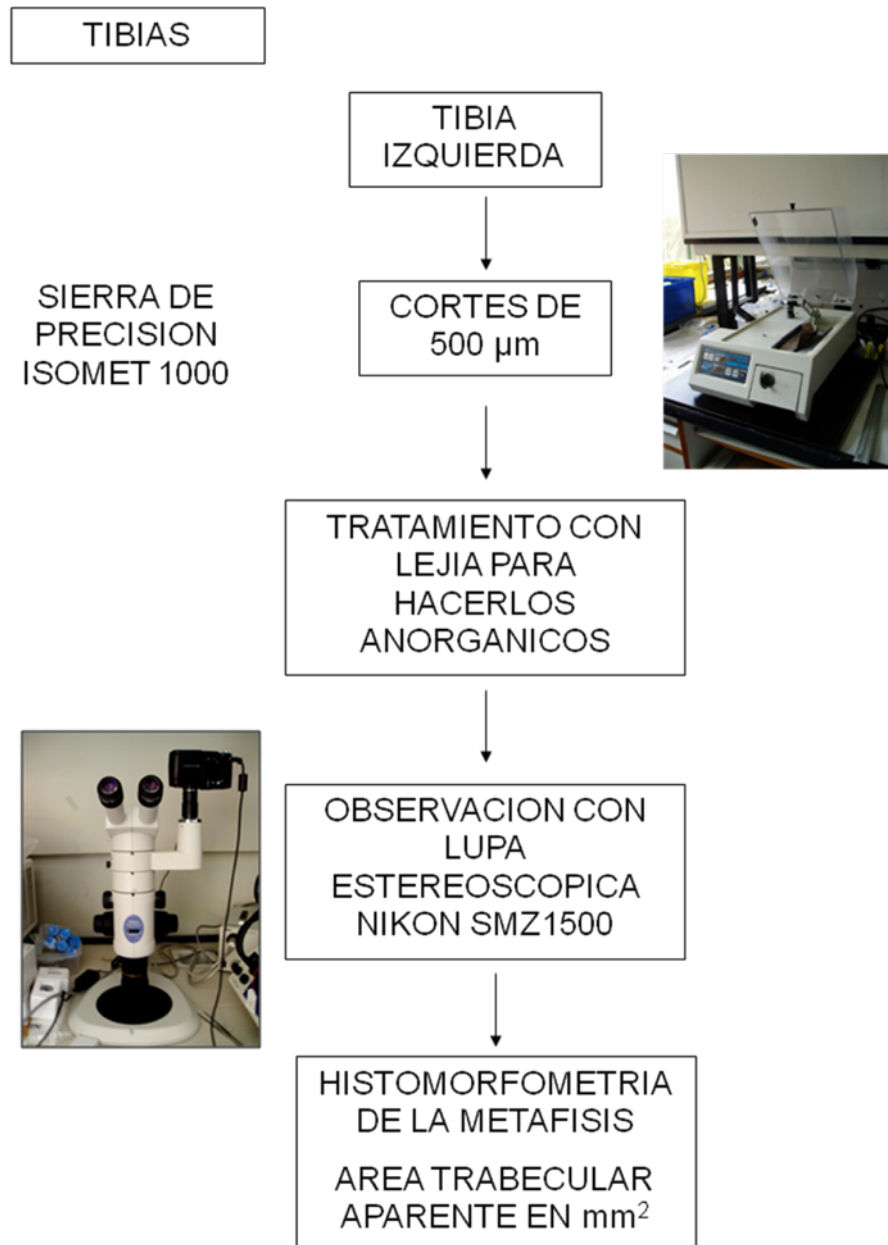
**Fig. 18: Detalle del tallado de una tibia izquierda de una rata.**

Los cortes se observaron con una lupa estereoscópica NIKON SMZ1500 con un objetivo plan 1x y se fotografiaron con la mayor profundidad de campo posible para conseguir nitidez en los planos superpuestos. A continuación las imágenes fueron digitalizadas en escala de grises y a continuación se aplicó la herramienta “umbral” del programa Image J (NIH) (figura 19).

La imagen resultante (B) de 1bit se analizó para el cálculo de la cantidad de hueso trabecular aparente una vez eliminados la cortical y la epífisis (C). Denominamos la medida como aparente pues un corte dado presentaba en distintos planos diferentes trabéculas superpuestas. La imagen resultante en realidad es la proyección en 2D de una imagen 3D. El voxel original medía  $500 \times 2,6 \times 2,6 \mu\text{m}$ , una resolución muy superior a los métodos microtomográficos de aplicación clínica (figura 20).



**Fig. 19: Microarquitectura 3 D de las tibias izquierdas de las ratas**



**Fig.20: Esquema del método para evaluar la microarquitectura 3 D en las tibiae izquierdas.**

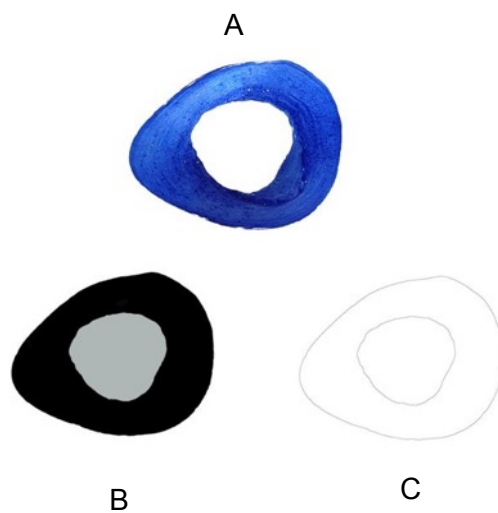
### **3.6.2. MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE LAS DIÁFISIS TIBIALES**

En este caso, tras la fijación en formol, se procedió a la deshidratación de las tibiae derechas mediante pases de las muestras por etanol al 70%, 90% y

100% respectivamente. El siguiente paso fue la inclusión de la muestra en polimetilmetacrilato (figura 21).



**Fig.21: Inclusión de las muestras en moldes de**



**Fig.22: Morfometría de las diáfisis tibiales  
derechas de las ratas.**

Se obtuvieron primero cortes de unas 500 µm localizados aproximadamente a 1 mm de la inserción del peroné en la tibia mediante la sierra de precisión Isomet 4000. Los cortes posteriormente se adelgazaron, utilizando la pulidora Phoenix Beta, hasta un grosor inferior a 100 µm y se tiñeron con azul de toluidina. A partir de un corte teñido (A) se obtiene una imagen del tejido óseo cortical en blanco y negro de 1bit (B) con un tamaño de pixel de 2,6 µm. Para ello la imagen original se analiza con el programa Image J (NIH) usando la herramienta “umbral”. Para el cálculo del área de hueso total, área de hueso cortical y área medular se cuenta el número de pixeles de cada sector y se multiplica por el tamaño real del pixel. De esta imagen se obtiene con la herramienta “contorno” otra de sus perímetros externo e interno de grosor 1 pixel (C) que se usa para el cálculo indirecto del grosor cortical (Ct.Th) Para ello se usa una fórmula que relaciona el área cortical y sus perímetros (figura 22).

$$Ct.Th = K. Area\ Cortical / Suma\ de\ los\ Perímetros\ Corticales.$$

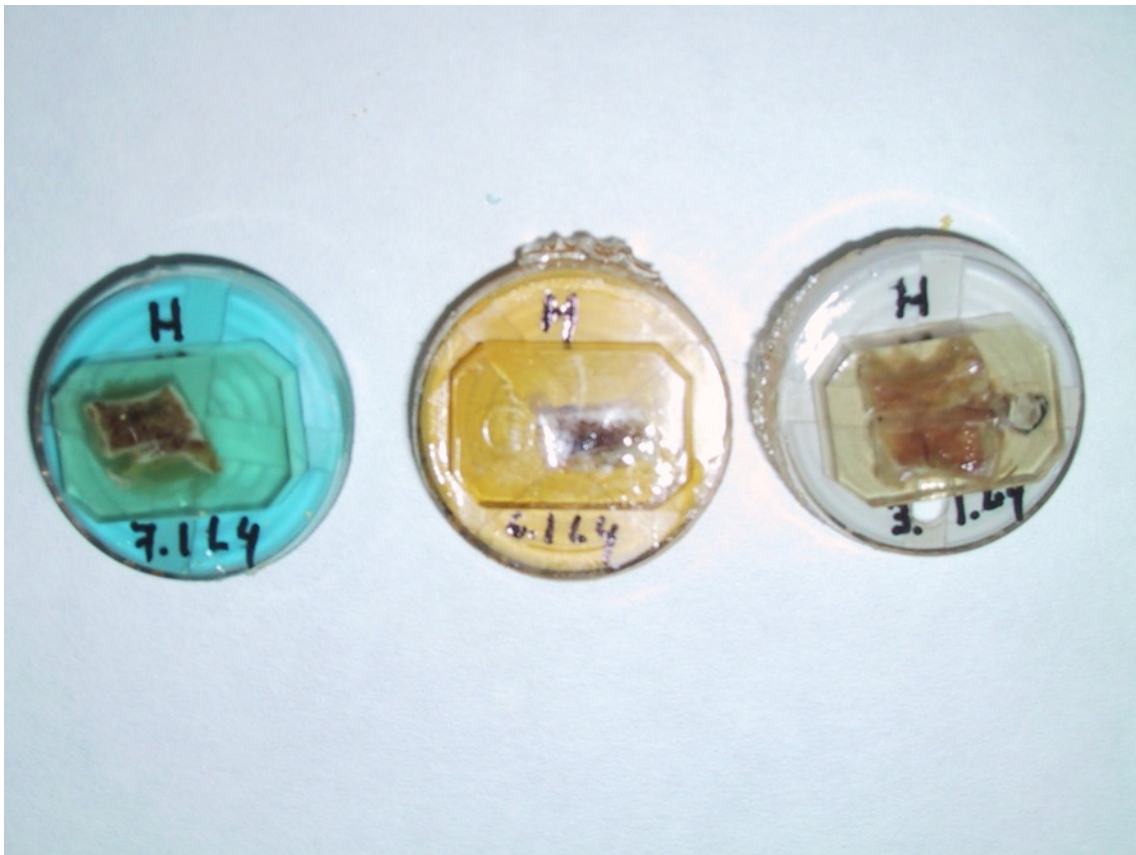
K es igual a 2x (tamaño de pixel).

### **3.6.3. HISTOMORFOMÉTRICOS EN LAS VÉRTEBRAS LUMBARES**

En este caso, tras la fijación y deshidratación de la muestras, la inclusión se realizó en glicolmetacrilato (figura 23).

Posteriormente para los cortes del bloque se utilizó el micrótopo Microm H 360 que en nuestro caso iba equipado de cuchillas de diamante lo que proporciona unos cortes de 2,5 µm de gran calidad (figura 24).

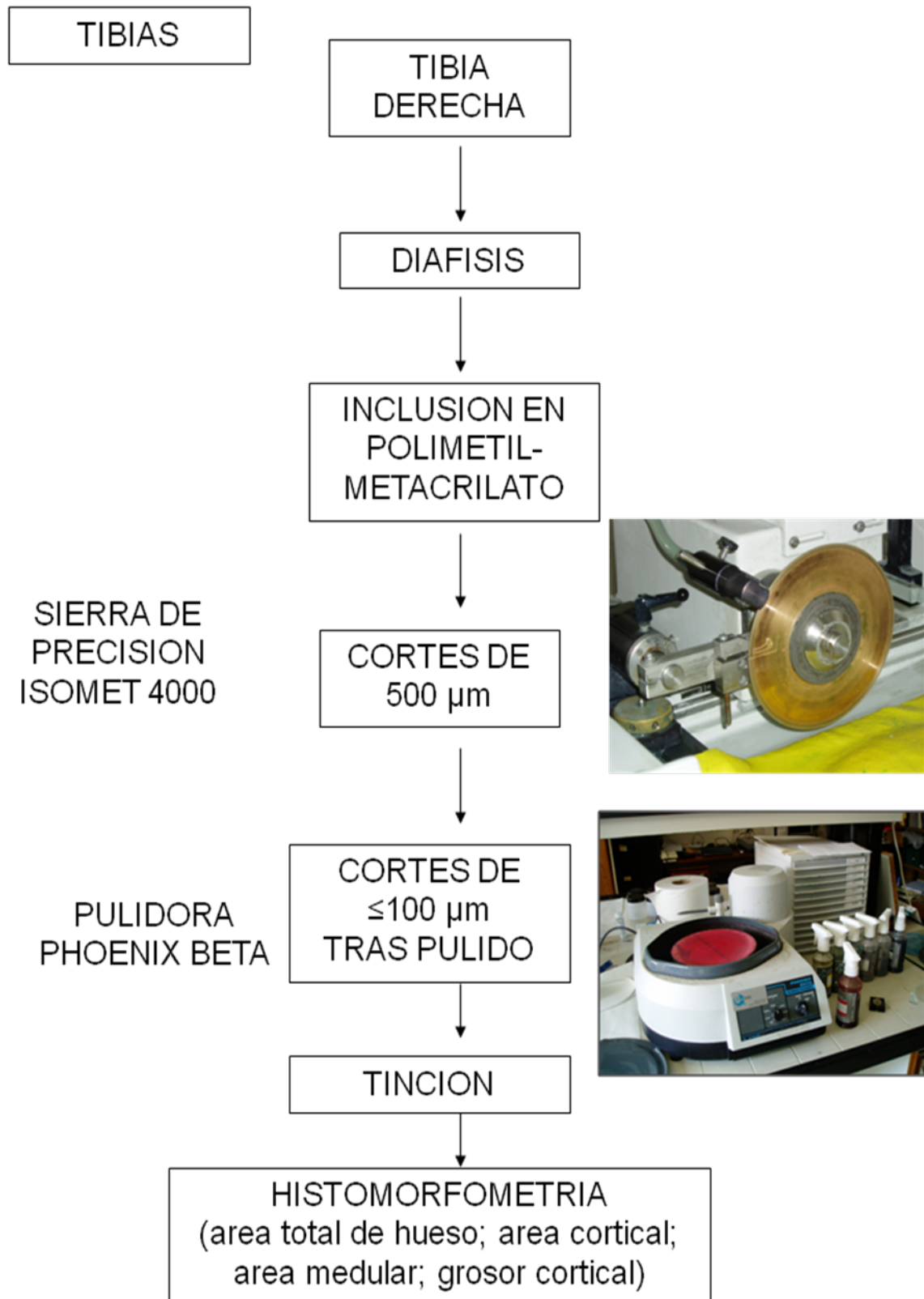




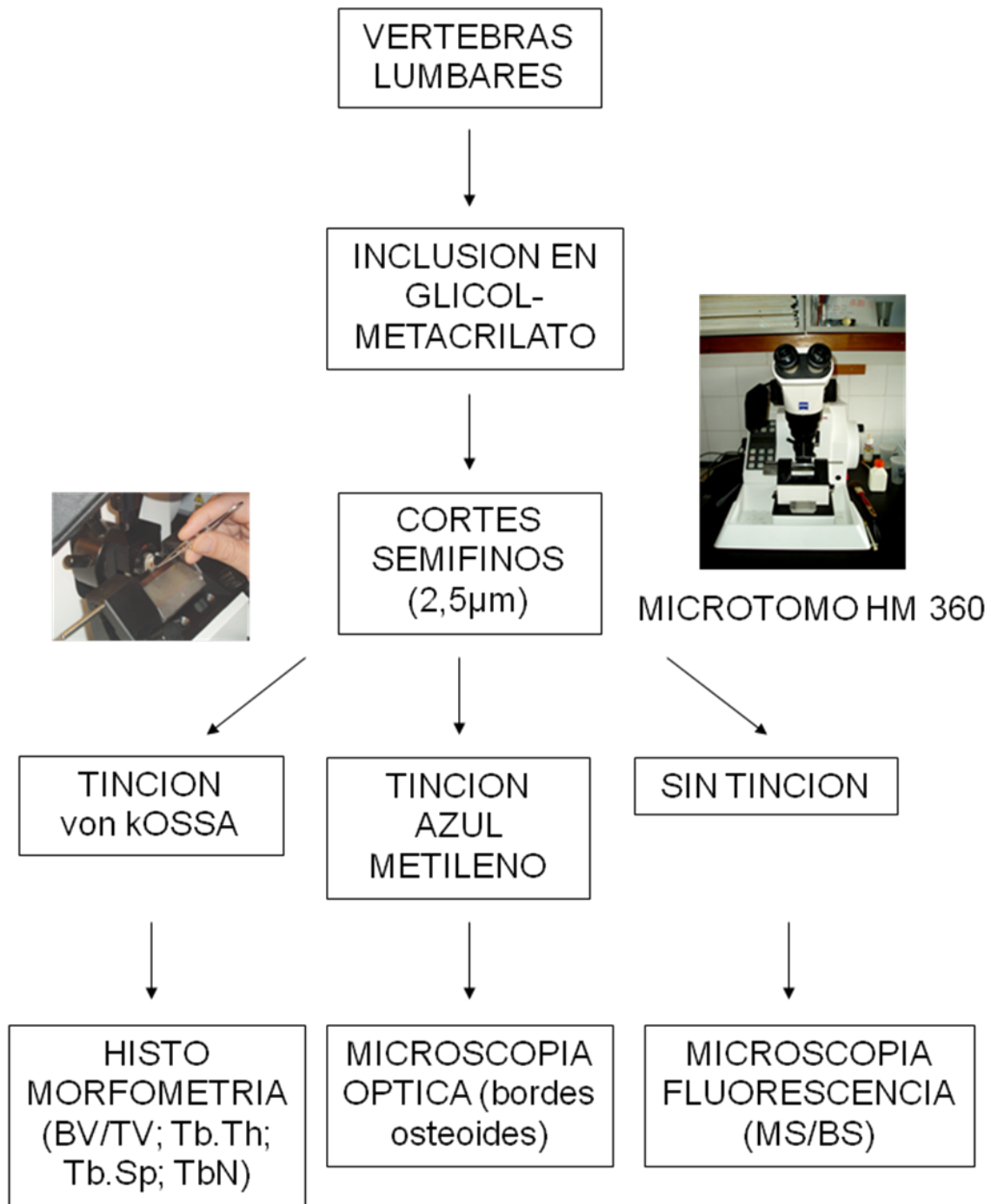
**Fig. 23: Detalle de las vértebras lumbares de las ratas incluidas en bloques de glicolmetacrilato.**

### 3.6.3.1. MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE LAS VÉRTEBRAS LUMBARES

A partir de un corte teñido con von Kossa (A) se obtiene una imagen de las trabéculas en blanco y negro de 1bit (B) con un tamaño de pixel de  $2,6 \mu\text{m}$ . Para ello la imagen original se analiza con el programa Image J (NIH) (figura 26), usando la herramienta “umbral”. Para el cálculo del BV/TV se cuenta el número de píxeles de las trabéculas y de las trabéculas más el espacio

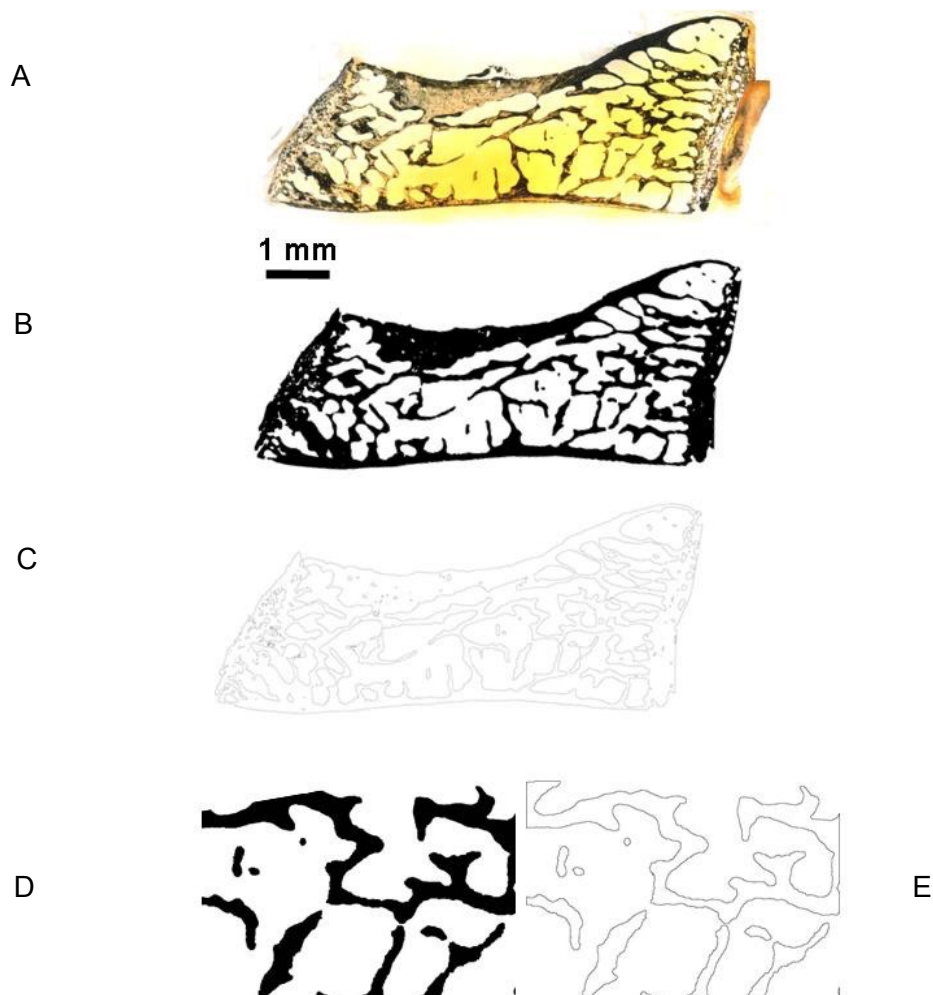


**Fig. 24: Esquema del método para la evaluación morfométrica de las diáfisis tibiales de las ratas.**



**Fig. 25: Esquema de la metodología para el estudio histomorfométrico de las vertebrae lumbares de las ratas.**

medular. De esta imagen se obtiene con la herramienta “contorno” otra de su perímetro externo de grosor de 1 pixel (C) que se usa para el cálculo indirecto



**Fig. 26: Morfometría de las vertebrae lumbares de las ratas. D y E muestran un detalle de un campo.**

del Tb.Th y Tb.Sp. Para ello se usa una fórmula que relaciona el área y el perímetro.

$Tb.Th = K \cdot \text{Área Trabecular} / \text{Perímetro Trabecular}$

$Tb.Sp = K \cdot \text{Área Medular} / \text{Perímetro Trabecular}$

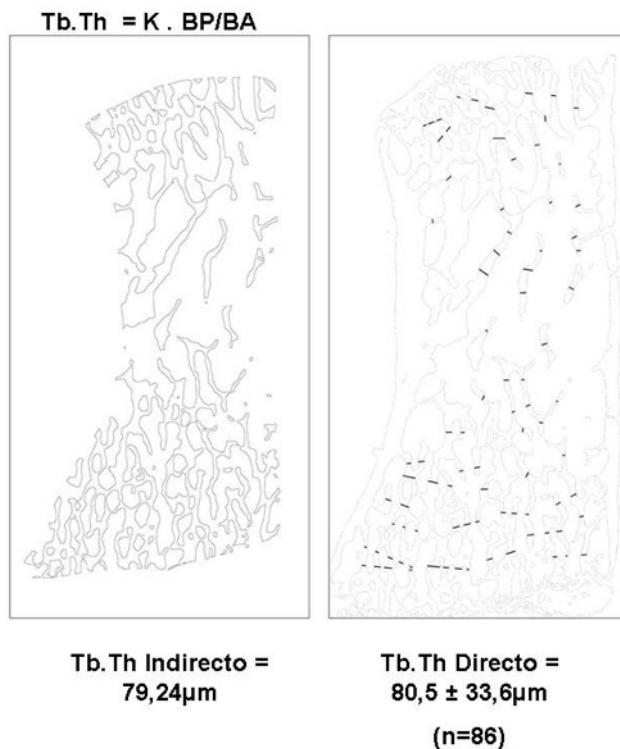
K es igual a 2x (tamaño de pixel)

### 3.6.3.2. MÉTODO PARA LA COMPARACIÓN DEL Tb.Th

Para ello usamos dos métodos, uno indirecto y otro directo (figura 27). El método indirecto calcula el Tb.Th a partir de una fórmula que relaciona el área y su perímetro:

$$\text{Tb.Th} = K \cdot \text{Area Trabecular} / \text{Perímetro Trabecular}.$$

El método es objetivo, fiable y rápido pero no permite establecer un histograma de la variabilidad del grosor. Para ello se usa el método directo, que consiste en medir en la imagen el grosor en numerosos puntos de las trabéculas mediante el trazado de una línea cuya longitud en píxeles se mide a continuación. Para que el método sea fiable se requiere múltiples medidas en todo el corte. Al menos se ha realizado un mínimo de 100. Sus inconvenientes son: necesidad de un muestreo muy amplio, y mucho tiempo en su realización.



**Fig. 27: Método para la comparación de Tb.Th.**

### 3.6.3.3. MÉTODO DE LOS MARCAJES FLUORESCENTES PARA ESTUDIO DINÁMICO MORFOMÉTRICO

Para marcar las superficies mineralizadas, se administró tetraciclina (Sigma-Aldrich®) de forma subcutánea a todas las ratas, a una dosis de 30 mg/kg/día (12 mg por rata, diluida en 0,5 ml de suero salino fisiológico) los días 10 y 3 antes del sacrificio.

#### **3.6.3.3.1. TIPOS DE MARCAJES: DOBLES O SENCILLOS**

Microfotografía de los tipos de marcaje fluorescente observados. Estos son dobles (D) o sencillos (S). Los marcajes dobles ocurren cuando la trabécula mineraliza en el periodo completo entre los dos marcajes. Notar que estos marcajes dobles sólo aparecen nítidamente en la parte central mientras en los bordes ambas marcas están fusionadas.

Los marcajes sencillos ocurren cuando el frente de mineralización activo es “sorprendido” bien durante el primer marcaje o bien durante el segundo. En este caso no es posible saber si un marcaje sencillo dado corresponde al primer o segundo tiempo. Para ello hay que utilizar sustancias fluorescentes distintas (por ejemplo, tetraciclina y calceína).

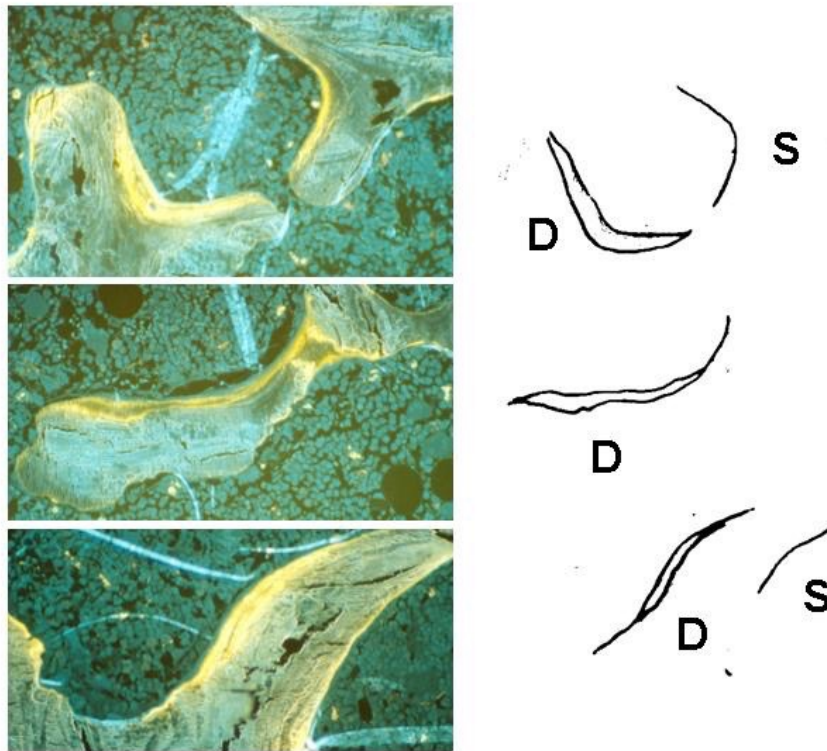
Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio NIKON Optiphot II provisto de sistema de fluorescencia episcópica EFD-3 e iluminación con lámpara de mercurio C-SHG1 (figura 28).



**Fig. 28: Microscopio Nikon Optiphot de fluorescencia.**



Las fotografías de la imagen se tomaron con un objetivo plan apo x20 (figura 29).

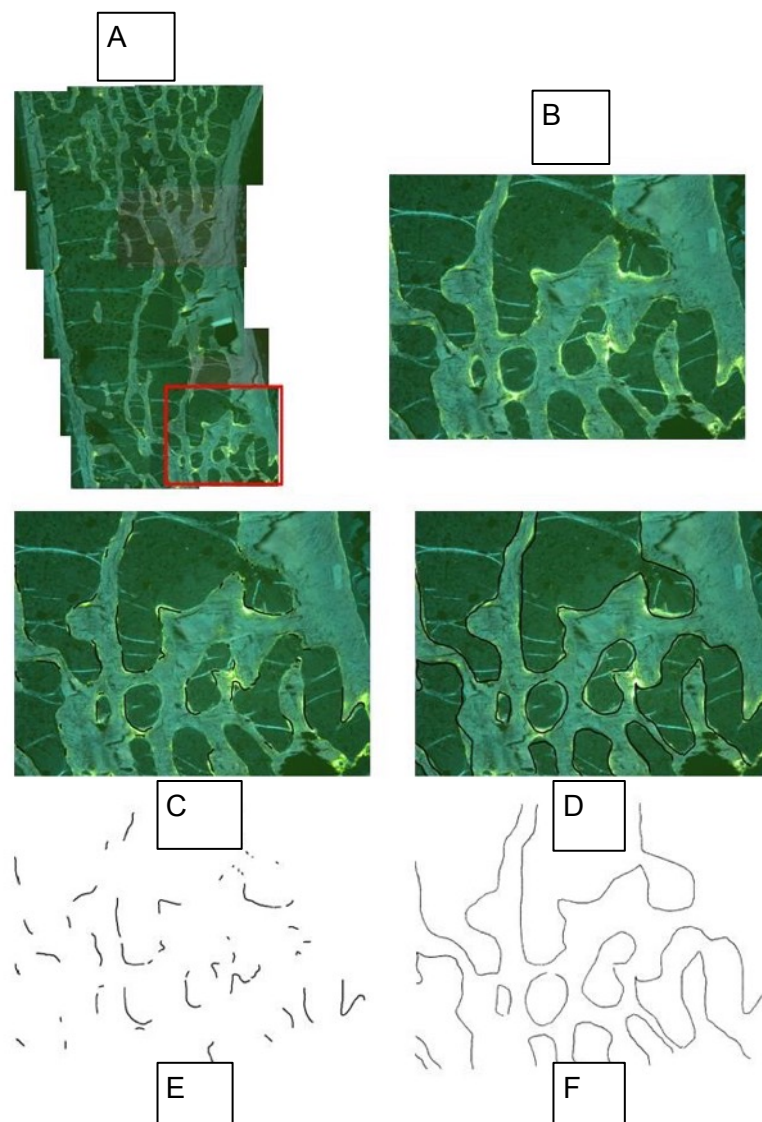


**Fig. 29. Microfotografía de los tipos de marcaje fluorescentes observados en nuestro estudio.**



### **3.6.3.3.2.METODO PARA MEDIR LOS MARCAJES. CÁLCULO DE MS/BS**

Los cortes de las vértebras de 2,5  $\mu\text{m}$  de grosor sin teñir se fotografiaron con epifluorescencia secuencialmente hasta cubrir toda su superficie con un objetivo plan apo x4. Las imágenes sirvieron para reconstruir el corte (A), o bien para ser analizadas individualmente (B). Para ello se procedió a marcar manualmente cada uno de los marcajes (sean dobles o sencillos) en una imagen (C) y en su copia los contornos trabeculares (D). A su vez estas imágenes se analizaron tras su “umbral” con el programa Image J (NIH= National Institute of Health,USA) para medir la suma de las longitudes de los marcajes o de los perímetros trabeculares (E y F) (figura 30).



**Fig. 30: Método para medir los marcajes fluorescentes. Cálculo de MS/BS.**

A partir de estos datos se calculó, expresado en porcentaje, la superficie mineralizante de acuerdo con la fórmula:

MS%= Suma longitud de los marcajes dobles y sencillos dividido por 2 y dividido por la suma de los perímetros trabeculares.

Este índice nos da idea de cuanta actividad de formación ósea sucede en el tiempo ocurrido entre marcajes, en cierto modo, nos da idea del recambio óseo en la rata, como resultado de dos acciones: Modelación (formación ósea directa en las trabéculas de novo sin pase por resorción) y Remodelación (formación ósea que sigue a una resorción).

Ambos procesos coexisten en ratas jóvenes, aunque la modelación va desapareciendo paulatinamente.

#### **3.6.4. ESTUDIO DE LAS SUPERFICIES MINERALIZANTES TEÑIDAS CON AZÚL DE METILENO PARA OBSERVAR EL REBORDE OSTEOIDE.**

Primero decalcificamos ligeramente la superficie del corte mediante ácido fórmico o EDTA. Ponemos unas gotas cubriendo la superficie y lo dejamos actuar alrededor de un minuto, lavamos al chorro del grifo. Tras esto sumergimos la muestra en el azul de metileno (1g de azul de metileno + 1g tetraborato de sodio + 100ml agua destilada), y lo metemos dos minutos al microondas a 90 W (mínima potencia). Tras esto sacamos el corte y lo lavamos al chorro del grifo, se deja secar al aire. Posteriormente se estudiaron las muestras con microscopio óptico.

### 3.7. MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO

#### 3.7.1. MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

Las determinaciones de **osteocalcina (BGP)** en suero se realizaron mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) comercial específico para BGP de rata (Rat- Osteocalcin IRMA kit, Inmunotopics) (figura 31). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo de este método fueron 2,3 % y 4,0 %, respectivamente. La sensibilidad de este ensayo fue de 0,01 ng/ml.

La **fosfatasa alcalina total (ALP)** en suero fue medida con un autoanalizador Roche modular DDPP. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo de este método fueron 0.67 % y 0.67 %, respectivamente. La sensibilidad, 1 UI/ml.



Fig. 31: Ensayo inmunoradiométrico (IRMA) comercial específico para Rata.

### **3.7.2. MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA**

Las determinaciones del **telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX)** en suero se realizaron mediante un inmunoensayo (ELISA) comercial específico para CTX de rata (Rat-Laps ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics).

Los coeficientes de variación intra e interensayo de este método fueron 5.6% y 10.5%, respectivamente. La sensibilidad de este ELISA fue de 2 ng/ml.

### **3.7.3. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS**

Las determinaciones de **calcio** en suero se realizaron por el método de la cresoltaleína-complexona [Parfitt et al] punto final, utilizando un autoanalizador Roche modular DDPP. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo de este método fueron 0.9 % y 1.5 %, respectivamente. Y la sensibilidad, 0.2 mg/dl.

Las determinaciones de **creatinina** sérica se realizaron por el método de Jaffé punto final, un método colorimétrico con picrato alcalino, utilizando para ello un autoanalizador Roche modular DDPP. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 0.7 % y 2.3 %, respectivamente. La sensibilidad de este método fue de 0.1 mg/dl.

### **3.8. ESTUDIO BIOMECÁNICO DEL HUESO**

Las propiedades mecánicas del hueso se midieron en los fémures derechos a temperatura ambiente tras extraerlos y limpiarlos de tejidos blandos

El ensayo mecánico de todos los huesos se realizó en el Laboratorio de Resistencia de Materiales de la UNED, siempre en una máquina de torsión a baja velocidad, con servocontrol, diseñada para realizar ensayos

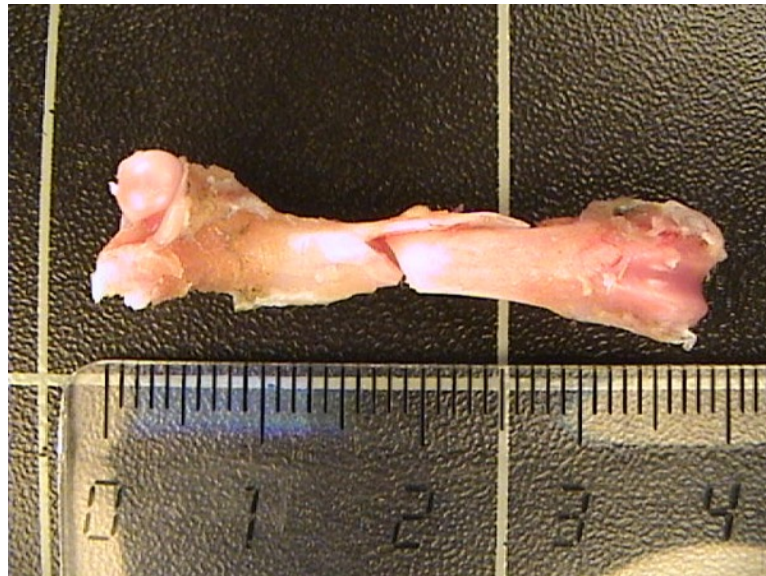
biomecánicos, marca Servosis, con el programa informático PCD 2 K, de control universal, diseñado para el sistema operativo Windows XP, y que se encarga de la realización de ensayos tanto estáticos como dinámicos (Fig. 32).



**Fig. 32: Máquina de torsión.** Detalle de fémur derecho momentos antes del ensayo de torsión.

La velocidad de ensayo fue 20°/minuto. Para realizar los ensayos se ha diseñado un útil que permite empotrar las epífisis de los fémures, constituido por una pieza cilíndrica hueca de 30 mm de diámetro interior, 5 mm de espesor y 15 mm de longitud, que presenta una fila de taladros roscados decalados 120° por donde se roscan los tornillos de sujeción. El fémur se inmoviliza por el par de aprietes de los tornillos, y para evitar las roturas y el desalineamiento de las epífisis del hueso se le reviste a ésta, en el momento de realizar el ensayo, de una cabeza protectora de polimetilmetacrilato (cemento óseo). Como la reacción es exotérmica se refrigera con suero salino hasta completar el fraguado.

La rotura se produjo en el tercio central de la diáfisis y de forma espiroidea como corresponde a un ensayo a torsión. Las roturas que no se producían en el tercio medio o que no tenían forma espiroidea fueron desechadas (Fig. 33).



**Fig. 33: Ejemplo de ensayo de torsión correcto.** Obsérvese que la rotura se produjo en tercio medio diafisario y de forma espiroidea.

Al realizar el test biomecánico de la muestra de hueso, se obtenían directamente, los siguientes parámetros, que vienen representados en la figura 34.

1. El momento o par torsor ( $M_{\text{torsor}}$ ) soportado por la pieza hasta la fractura (Nm).
2. El ángulo girado máximo o deformación (Ángulo) soportado por la pieza hasta la fractura (grados)
3. La energía absorbida ( $E_{\text{abs}}$ ) hasta la fractura (en Julios).



4. Módulo de elasticidad en torsión o rigidez intrínseca (Rigidez) del hueso (nm/grados), es una medida de la resistencia del material a las deformaciones cortantes.

En primer lugar, se obtiene el momento torsor máximo, representado en la gráfica como la altura máxima de la curva (eje de coordenadas), y la deformación angular correspondiente al valor del momento torsor máximo (eje de abscisas).

La energía absorbida viene dada por la estructura ósea y se corresponde con el área obtenida bajo la curva y, por último, la rigidez intrínseca del hueso, se representa como la pendiente de la curva en la zona elástica (zona intermedia de la curva).

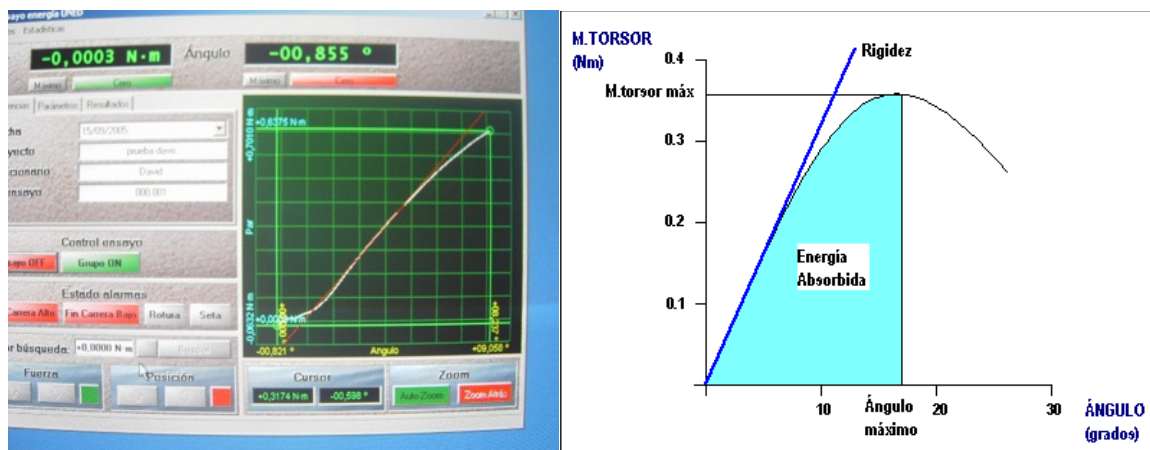


Fig. 34: Representación gráfica del del test biomecánico.

### **3.9. ESTADÍSTICA APLICADA**

Los estadísticos descriptivos empleados en el texto para datos cuantitativos continuos han sido los parámetros habituales de media y desviación estándar (programa estadístico Medical Software).

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test estadístico de Kolmogorov-Smirnoff, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows V 9.0 (SPSS Inc, Chicago, II).

Aunque las variables demostraron ser compatibles con la distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnoff no significativo) y el tamaño muestral manejado fuera suficiente para poder emplear estadística paramétrica convencional (test t de student), se optó por manejar pruebas no paramétricas. De esta forma se redujeron las consecuencias que puede tener un valor extremo sobre un pequeño conjunto de medidas y se aproximó de una manera más correcta al valor de probabilidad que estiman los test de hipótesis.

El test de hipótesis utilizado para tratar los datos obtenidos en este trabajo fueron el test de Mann-Whitney.

El nivel de significación estadística se estableció con un error tipo I igual o inferior a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).



# IV. RESULTADOS

---

## 4. RESULTADOS

Las dosis del fármaco intramuscular fueron bien toleradas por todos los animales, no apreciándose ningún tipo de lesión cutánea, reacción ni efecto adverso al tratamiento.

Las tasas de mortalidad asociada a la orquidectomía ( 4 casos) se distribuyeron uniformemente entre los grupos. No hubo fallecimientos fuera de la semana posterior a la orquidectomía. No obstante, para evitar la pérdida de la potencia estadística de nuestro estudio, las ratas fallecidas fueron sustituidas por ratas de reserva de la misma edad y características.

### 4.1. DENSITOMETRÍA MINERAL ÓSEA POR DEXA

La tabla 6 muestra la DMO en fémur (DMOF) y en columna lumbar (DMOC) por DEXA de los grupos experimentales estudiados.

	Machos (M)	
	DMOF	DMOC
SHAM1	0.311 ± 0.019	0.251 ± 0.018
OQX1	0.309 ± 0.022	0.244 ± 0.0005
OQX+PTH1	0.332 ± 0.008b,c	0.272 ± 0.017b,c
SHAM2	0.325 ± 0.028	0.255 ± 0.019
OQX2	0.311 ± 0.016a	0.249 ± 0.008
SHAM3	0.306 ± 0.021	0.265 ± 0.019
OQX3	0.276 ± 0.020a	0.222 ± 0.018a
OQX+PTH3	0.306 ± 0.017c	0.257 ± 0.006c

**Tabla 6. Densidad mineral ósea (DMO) (gr/cm<sup>2</sup>) medida en fémur (F) y en columna lumbar (C), en ratas Wistar machos (M).**

Transcurridos 72 días desde la orquidectomía (OQX1) no se observaron diferencias significativas en la DMO ni a nivel femoral (DMOF) ni a nivel lumbar (DMOC). Sin embargo, después de 6 meses de la orquidectomía (OQX2) se

observó ya un descenso significativo de la DMO en fémur, aunque no en columna, y a los 8,5 meses desde la castración (OQX3), un descenso significativo de la DMO en fémur y columna.

El tratamiento con PTH inmediatamente después de la orquidectomía (OQX+PTH1) produjo un aumento de la DMO por encima incluso de las ratas control (SHAM1) tanto a nivel femoral como lumbar (tabla 6).

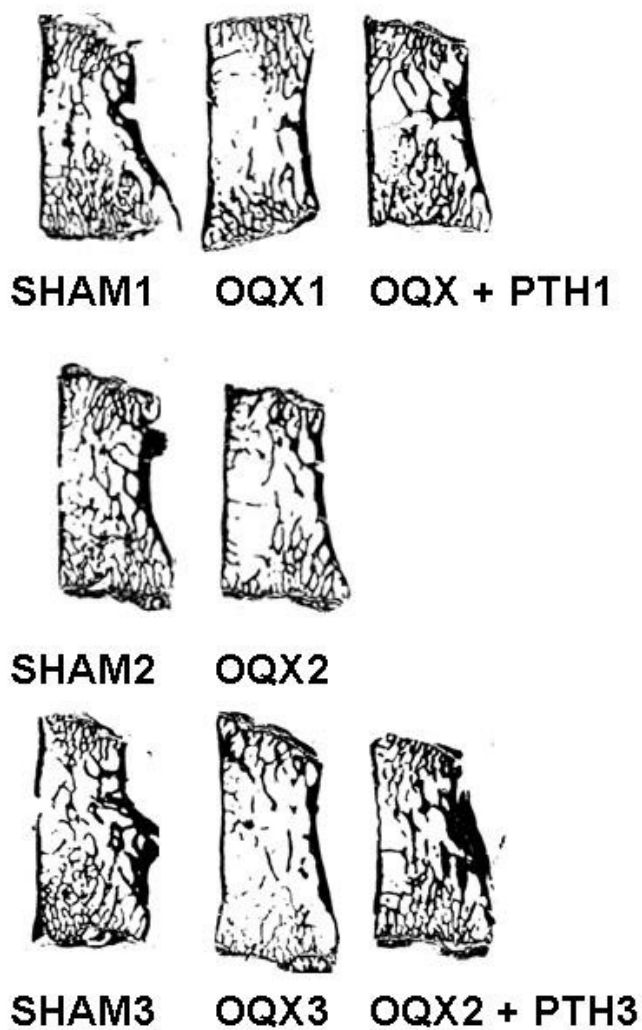
La administración de PTH a las ratas que habían desarrollado osteopenia tras 6 meses de orquidectomía (OQX+PTH2) restauró los niveles de DMO tanto en fémur como en columna lumbar con respecto a las ratas control (SHAM3).

## **4.2. HISTOMORFOMETRÍA**

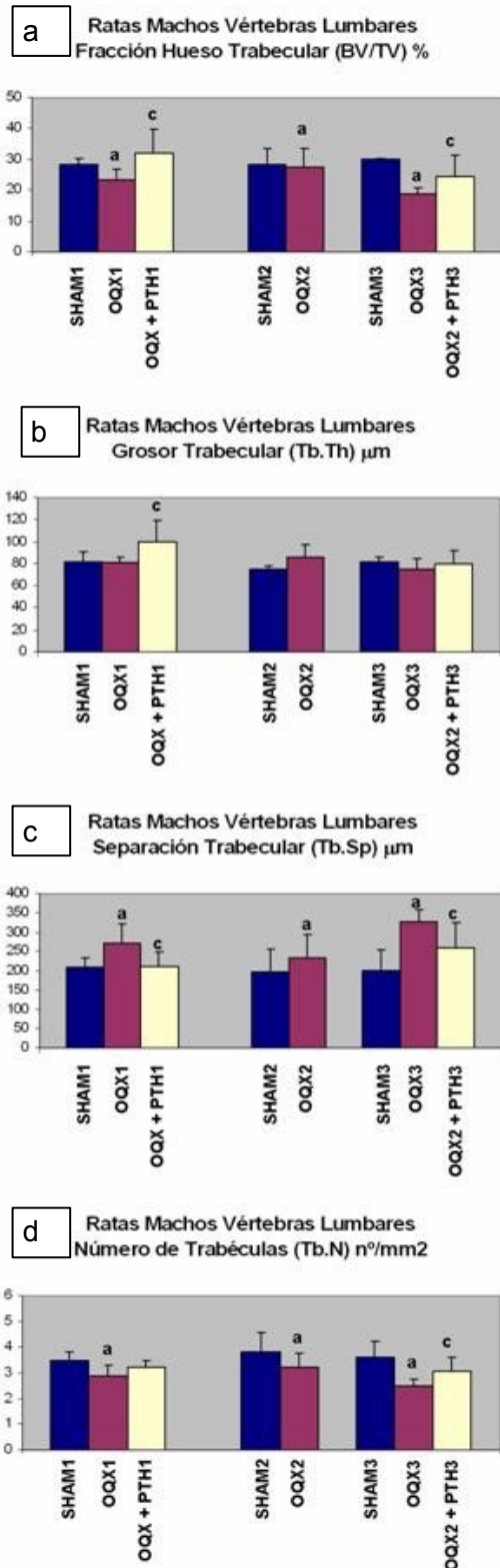
### **4.2.1. RESULTADO DEL ESTUDIO MORFOMÉTRICO EN LAS VÉRTEBRAS LUMBARES**

En las ratas castradas el cambio más significativo ocurre a nivel del BV/TV (porcentaje de la cantidad de hueso) y la separación trabecular (Trabecular Spacing Tb.Sp). Ello condiciona asimismo un descenso en el número trabecular.

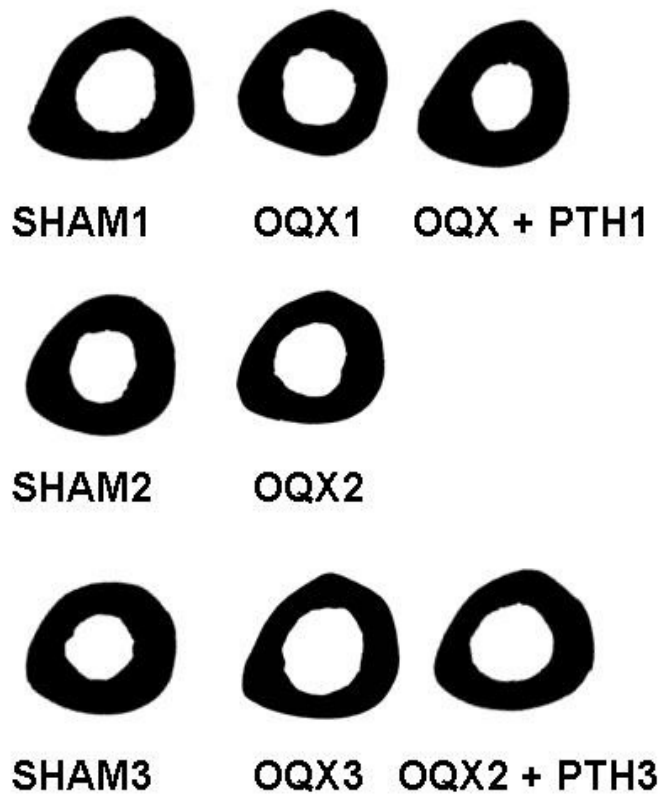
El efecto de la PTH se nota sobre todo en un incremento en el BV/TV en ambos estudios. Además en el estudio preventivo hay un incremento en el grosor de las trabéculas en las ratas tratadas con PTH. Lo que se interpreta como incremento de la formación ósea por aposición sobre la trabécula preexistente (Figura 35).



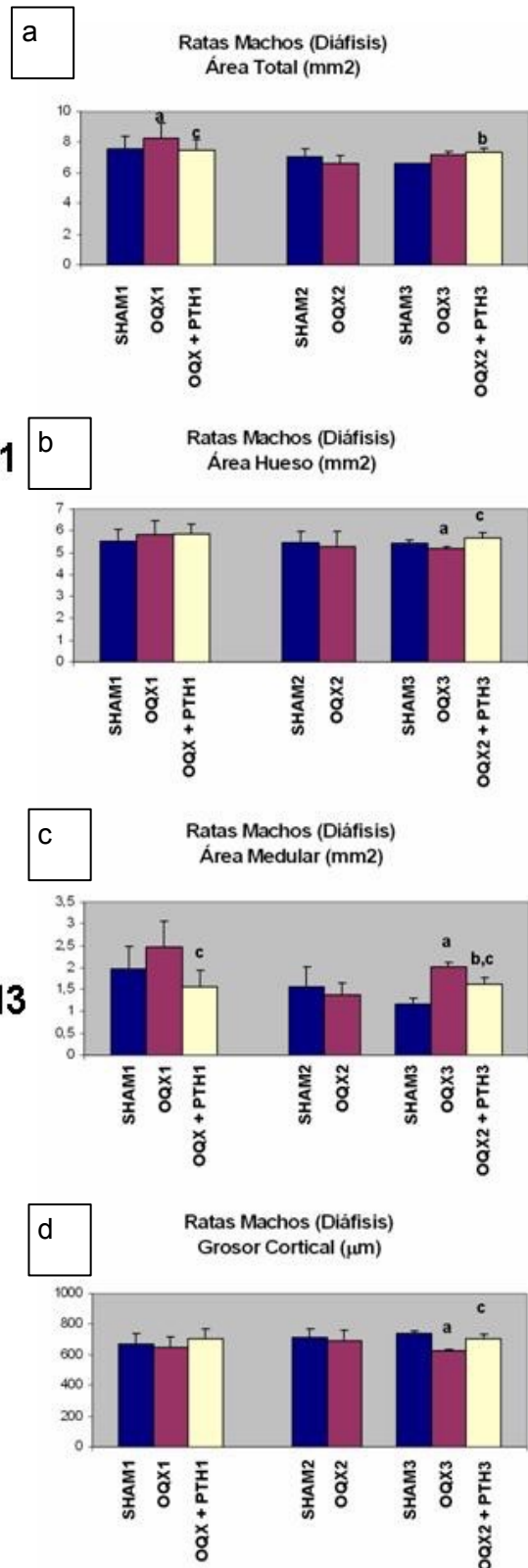
Significación  $p \leq 0,01$  a sham vs oqx, b sham vs oqx+pth, c oqx vs oqx+pth respectivamente.



**Figura 35.** Resultado del estudio de la microarquitectura de la metáfisis TIBIALES 3D y su medida de cantidad de hueso trabecular “aparente” en  $\text{mm}^2$ .



Significación  $p \leq 0,01$  a sham vs oqx, b sham vs oqx+pth, c oqx vs oqx+pth respectivamente.



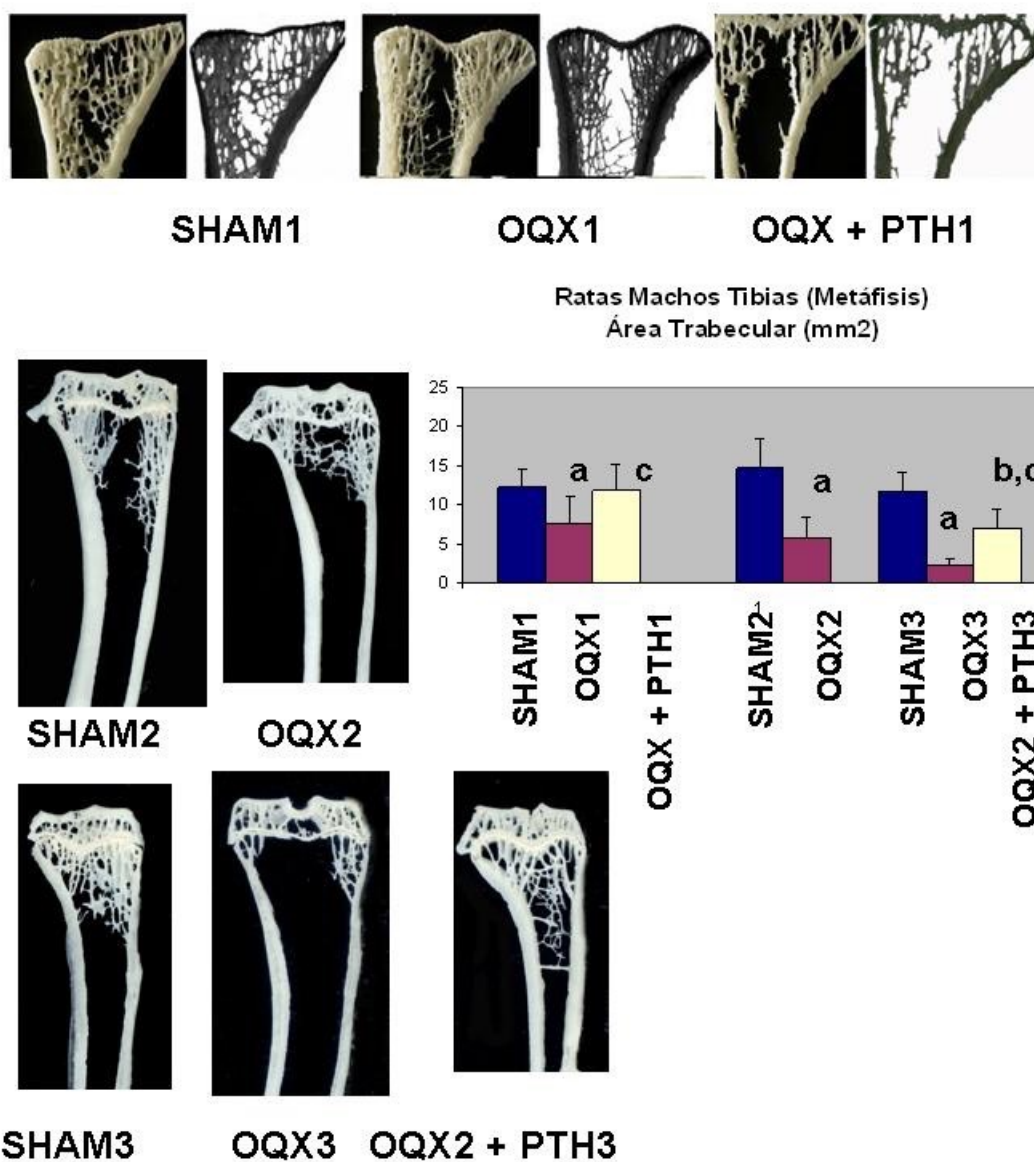
**Figura 36.** a) Volumen óseo/ volumen óseo total (BV/TV), b) grosor trabecular (Tb.th), c) separación entre trabéculas (Tb.Sp) y d) número de trabéculas (Tb.N) en ratas Wistar machos.

#### **4.2.2. RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA MICROARQUITECTURA DE LA METÁFISIS TIBIALES 3D Y SU MEDIDA DE CANTIDAD DE HUESO TRABECULAR “APARENTE” EN MM2.**

La figura 36 muestra el área aparente de las metáfisis tibiales en todos los estudios. En el estudio preventivo, después de 72 días de orquidectomizadas (OQX1), las ratas muestran un descenso significativo del área aparenter medida en mm<sup>2</sup>, y cuando las tratamos con PTH (OQX + PTH1) vuelven a los valores de los controles (SHAM1).

En el estudio curativo, después de 6 meses de orquidectomizadas las ratas (OQX3), todavía es más acusado el descenso del área trabecular con respecto a las ratas orquidectomizadas después de 72 días, y con el tratamiento con PTH aumentamos el área trabecular pero sin llegar a alcanzar los valores de las ratas controles.

Las imágenes muestran como en las OQX ocurre una disminución drástica de la cantidad de hueso trabecular en las metáfisis. Notar que el adelgazamiento y la desaparición de las trabéculas comienza en la zona central, mientras que las trábeculas que conectan lateralmente la placa epifisaria y la cortical subsisten e incluso se engruesan por la función mecánica de sostén necesaria para la integridad ósea. Los cambios son más acusados que a nivel vertebral, lo que indica que las metáfisis tibiales son de alto recambio óseo.



Significación  $p \leq 0,01$  a sham vs oqx, b sham vs oqx+pth, c oqx vs oqx+pth, respectivamente.

**Figura 37.** Morfometría de las diálisis tibiales (grosor cortical), a) área total, b) área total del hueso, c) área medular, d) grosor cortical de las ratas

#### **4.2.3. RESULTADO DEL ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA DIÁFISIS TIBIAL.**

Como muestra la figura 37a, en el grupo preventivo, las ratas tras 72 días orquidectomizadas (OQX1), muestran un área total mayor que el grupo control (SHAM1) y que el grupo tratado con PTH de forma preventiva (OQX+PTH1), pero es sobre todo a expensas de aumentar el cilindro diafisario y no como ocurre el tratado con PTH (OQX+PTH1), en el que el área total, aunque es similar al grupo control, lo hace aumentando el grosor cortical (figura 37b) y disminuyendo el área medular (figura 37c).

El grupo OQX1 ofrece sobre todo una modificación en la geometría del cilindro diafisario, éste se agranda (valores de área total) como resultado de una adaptación mecánica a la nueva situación. Como se ve el espacio medular se agranda pero la cantidad de hueso se mantiene pero distribuida más periféricamente (del centro de gravedad) para mantener su eficacia. Finalmente en el OQX3 (figura 37d) se puede notar ya una disminución en el grosor cortical.

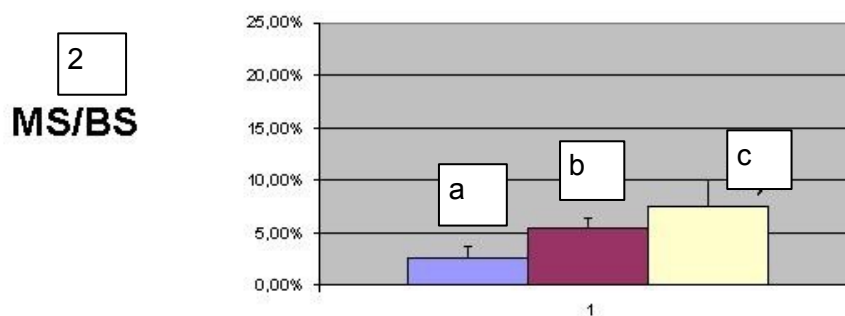
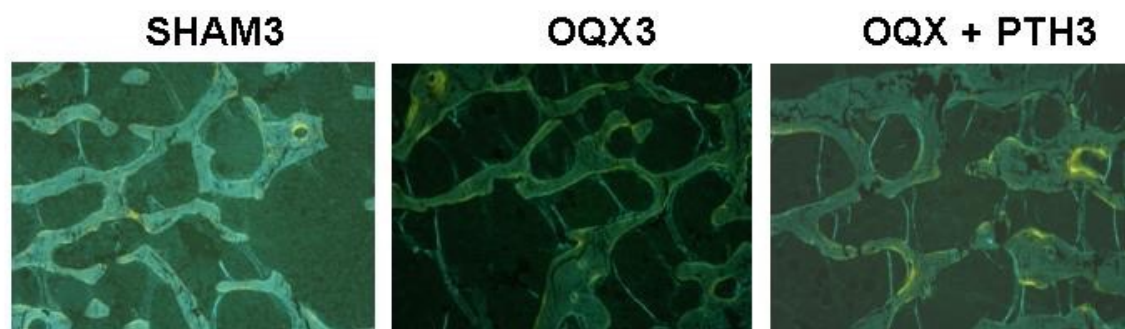
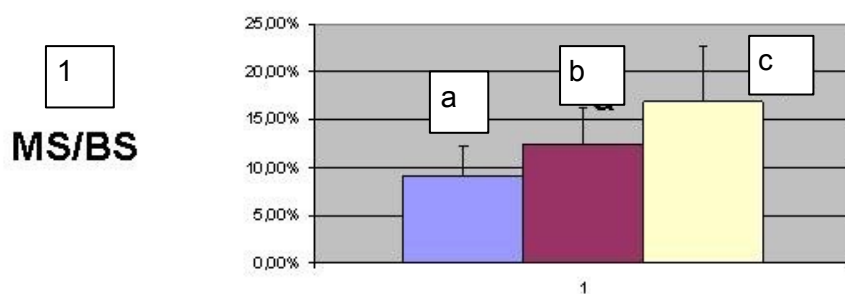
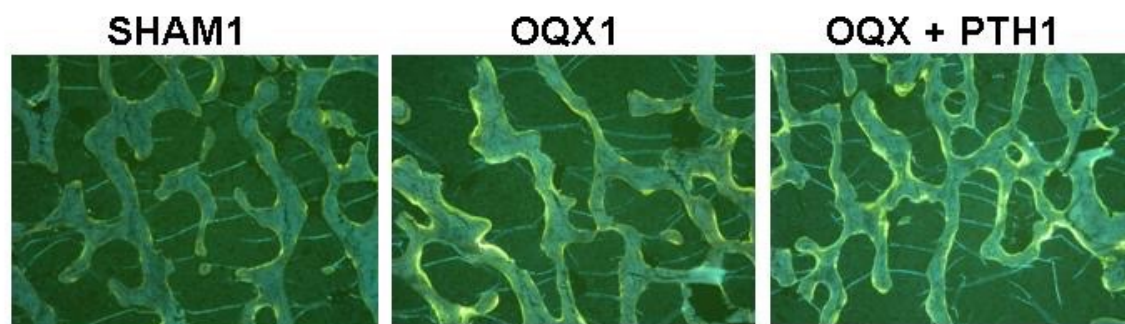
El efecto de la PTH se nota primero en la geometría resultante cuya sección (área total) es menor que en los OQX y se aproxima a los SHAM. Igualmente se incrementa el grosor cortical, resultado de un proceso de aposición ósea mayor tanto en su periostio (perímetro externo) como endóstico (perímetro interno). El primer proceso permite “crecer” hacia fuera (aumento del perímetro externo y consecuentemente del área total) y el segundo “rellena” el espacio medular que disminuye su área.



#### **4.2.4. RESULTADO DEL ESTUDIO DINÁMICO DE LOS MARCAJES DE TETRACILCINA EN LAS VÉRTEBRAS LUMBARES EN AMBOS GRUPOS.**

En el grupo preventivo (figura 38a) tanto el OQX1 como el OQX+PTH1 ofrece un porcentaje de superficies mineralizantes mayor que el SHAM1. Esto indica que la castración produce un incremento muy acusado en el recambio óseo (resorción-formación) como también indica la bioquímica. Cuando además se da PTH la mineralización aumenta aún más.

En el grupo curativo (figura 38b), que corresponde a ratas muy adultas en las que el crecimiento prácticamente se ha detenido, el recambio óseo es menor (unas 7 veces), aunque con PTH parece incrementar unas 3 veces sobre el control y OQX3.



**Significación  $p \leq 0,01$  a sham vs oqx, b sham vs oqx+pth, c oqx vs oqx+pth respectivamente.**

**Figura 38.** Estudio dinámico de los marcajes con tetraciclinas. 1. a) Sham1, b) OQX1, c) OQX+PTH1. 2. a) Sham3, b) OQX3, c) OQX+PTH3.

#### **4.2.5. COMPARATIVA DEL EFECTO DE LA PTH AMBOS GRUPOS. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA X20**

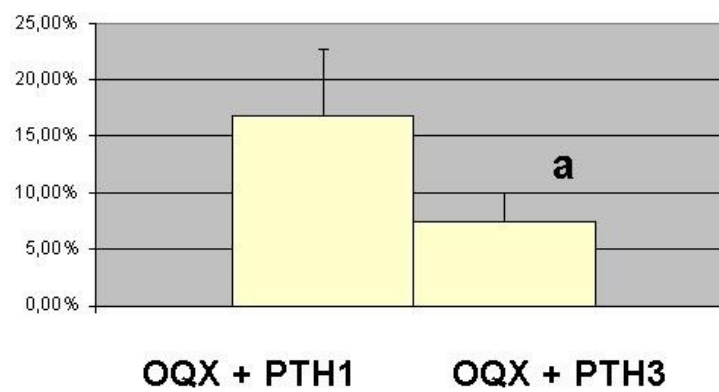
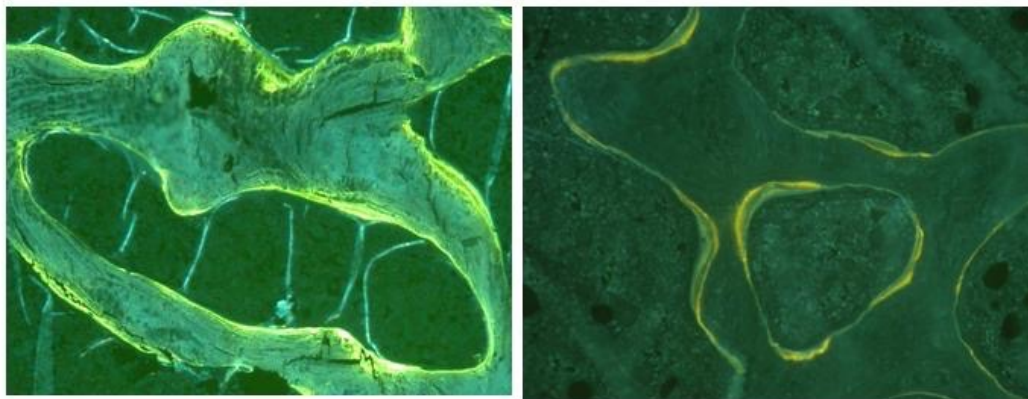
Como puede verse la superficie marcada es mucho mayor en el grupo curativo. Es más en éste son frecuentes los marcajes dobles, mientras que en el grupo curativo estos son excepcionales.

Así podemos distinguir dos efectos de la PTH. El primero es primario y directo a su efecto en los osteoblastos, y en las superficies mineralizantes individualmente. La PTH condiciona una mayor síntesis de matriz ósea para mineralizar y mejora la formación ósea allí donde existe.

El segundo efecto, y que queda ilustrado en la comparativa, es secundario a la cantidad de sitios mineralizantes existentes. Esta cantidad está condicionada por la tasa de recambio óseo previo. Así la tasa es mayor en el experimento corto (como también indica la bioquímica), de ahí que sus resultados globalmente sean más espectaculares.

Nótese que en las imágenes puede verse como en el grupo preventivo (OQX +PTH1) la extensión de los marcajes es mucho mayor que en el grupo curativo (OQX+PTH3). En parte esto es así porque en la rata más joven (todavía en crecimiento) concurre modelación (reclutamiento directo de osteoblastos) y remodelación (reclutamiento de osteoblastos tras el pase de osteoclastos) (Figura 39).

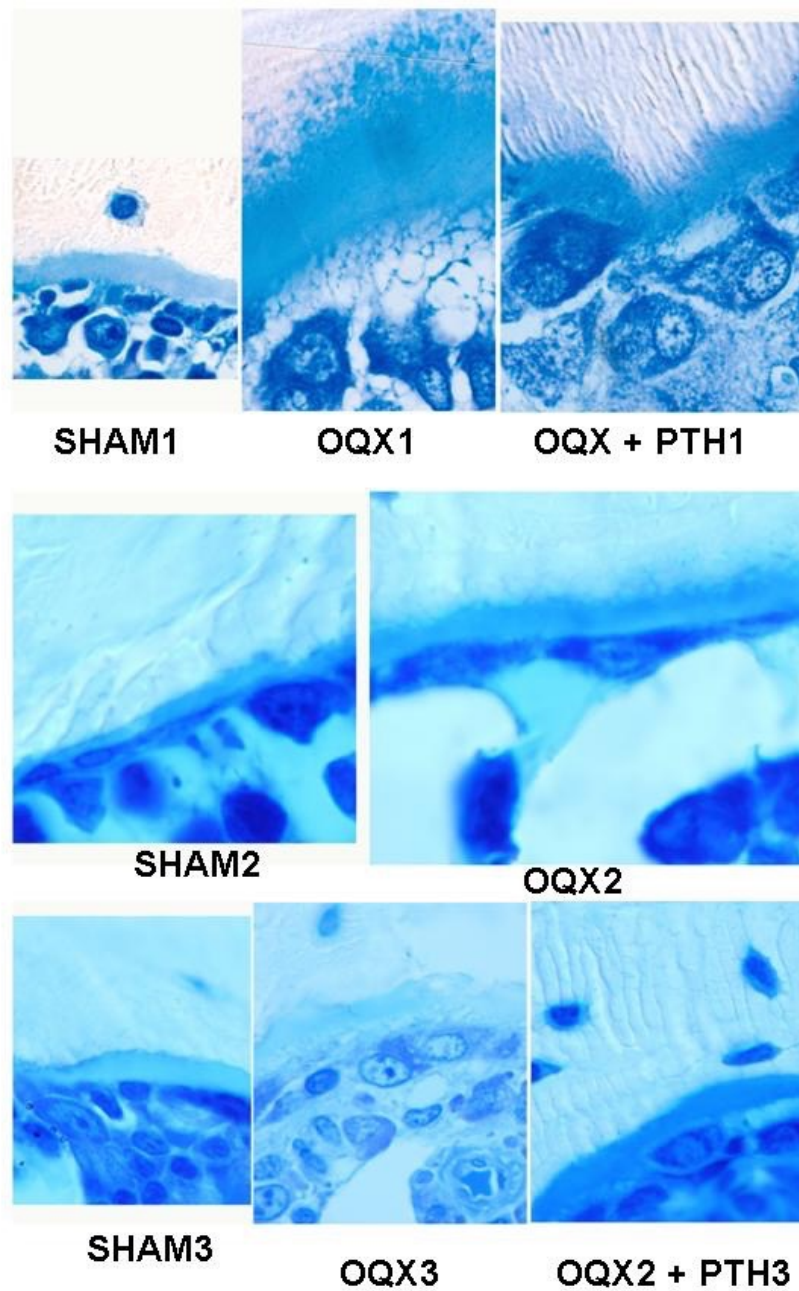
**Figura 39.** Comparativa del efecto de la PTH con los marcajes de tetraciclinas en ambos grupos de estudio, a) Grupo preventivo (OQX+ PTH1) y b) Grupo curativo (OQX+PTH3).COMPARATIVA DE LAS SUPERFICIES MINERALIZANTES TEÑIDAS CON AZUL DE METILENO PARA OBSERVAR EL REBORDE OSTEOIDE (OBJETIVO X100).



#### **4.2.6.COMPARATIVA DE LAS SUPERFICIES MINERALIZANTES TEÑIDAS CON AZUL DE METILENO PARA OBSERVAR EL REBORDE OSTEOIDE (OBJETIVO X100).**

Uno de los cambios más llamativos que ocurre tras la deprivación androgénica es una perturbación en la mineralización normal del osteoide. Esto queda patente en la foto de OQX1 de la Figura 40. El reborde osteoide es de 2 a 3 veces más grueso que en el SHAM o en el OQX+PTH. Esto indica que aunque la síntesis de matriz ósea premineralizable no está alterada en el OQX1, si lo está su condición de mineralizar o su mecanismo de mineralización. Una situación que la PTH mejora sin lugar a dudas.

Estos trastornos de mineralización se van atenuando con el paso del tiempo en los OQX2y3, los rebordes osteoides ya no son tan amplios.



**Figura 40.** Comparativa de las superficies mineralizantes teñidas con azul de Metileno (objetivo x100).

### **4.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO**

Los valores muestran un aumento significativo del remodelado óseo, tanto a nivel de formación (BGP y FA) como a nivel de resorción (CTX), tras 72 días de realizarse la orquidectomía (OQX) a los animales. Dicho aumento, sin embargo, solamente fue mantenido en el caso de la BGP tras 6 (OQX1) y 8,5 meses (OQX2) desde la operación. El marcador de resorción estudiado (CTX), en ratas operadas durante 6 (OQX1) y 8,5 meses (OQX2), mantuvo unos valores similares a los valores de las ratas control (SHAM1 y SHAM2, respectivamente). Los niveles de FA en ratas orquidectomizadas durante 8,5 meses (OQX2) se encontraban significativamente disminuidos respecto a los de las ratas control (SHAM2); pero eran similares a estos a los 6 meses de la operación.

El tratamiento con PTH inmediatamente después de la orquidectomía durante 72 días (OQX + PTH), mantuvo los niveles significativamente elevados de remodelado óseo (BGP, FA y CTX) respecto de los valores de las ratas control (SHAM); y con tendencia, aunque no significativa, a ser incluso más elevados que los de las ratas orquidectomizadas sin tratamiento (OQX).

A partir de 6 meses desde la orquidectomía (OQX2 + PTH), sólo continuaron significativamente elevados, por efecto de la PTH, los niveles de los marcadores de formación (BGP y FA) respecto de los de las ratas control (SHAM2), mientras que los niveles del marcador de resorción (CTX) no fueron estadísticamente diferentes.

#### 4.4. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Es interesante destacar que el tratamiento con PTH no afectó a los niveles de creatinina en ninguno de los grupos estudiados y que se mantuvieron los niveles de calcemia (tabla 8).

	Machos	
	Creatinina	Calcio
SHAM	0.48 ± 0.05	10.26 ± 0.33
OQX	0.53 ± 0.03a	10.30 ± 0.25
OQX/OVX + PTH	0.53 ± 0.06	10.37 ± 0.15
SHAM1	0.46 ± 0.05	10.69 ± 0.25
OQX1	0.46 ± 0.07	10.49 ± 0.38
SHAM2	0.44 ± 0.03	10.58 ± 0.20
OQX2	0.53 ± 0.15	10.78 ± 0.32
OQX2 + PTH	0.54 ± 0.06b	10.69 ± 0.23

**Tabla 8-** Niveles de Calcio y creatinina.

#### 4.5. ESTUDIOS BIOMECÁNICOS

En la determinación de las propiedades mecánicas del hueso, se aceptaron para este ensayo aquellos huesos cuyas roturas se produjeron en el tercio medio de la diáfisis y con un ángulo aproximado de 45 grados. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en las propiedades biomecánicas de ninguno de los grupos de ratas estudiados (tabla 9).



	Machos			
	M.torsor	Ángulo	Rigidez	E.abs
SHAM	0.45 ± 0.17	9.51 ± 2.37	0.059 ± 0.030	2.32 ± 0.84
OQX	0.47 ± 0.16	7.70 ± 3.56	0.064 ± 0.028	2.00 ± 1.24
OQX/OVX + PTH	0.52 ± 0.14	12.83 ± 5.88	0.071 ± 0.020	3.22 ± 1.47
SHAM1	0.55 ± 0.12	13.31 ± 3.49	0.072 ± 0.030	4.16 ± 0.81
OQX1	0.43 ± 0.15	9.36 ± 4.44	0.065 ± 0.012	1.70 ± 0.89
SHAM2	0.65 ± 0.14	12.37 ± 0.83	0.077 ± 0.018	4.71 ± 1.41
OQX2	0.64 ± 0.24	11.13 ± 2.13	0.083 ± 0.030	4.27 ± 2.04
OQX2 + PTH	0.62 ± 0.13	9.84 ± 3.14	0.090 ± 0.017	3.59 ± 1.62

**Tabla 9.** Parámetros biomecánicos analizados en los distintos grupos de estudio

# V. DISCUSIÓN

---

## 5. DISCUSIÓN

La OP del varón emerge como un tema de relevancia entre las enfermedades del metabolismo óseo, existiendo en los últimos tiempos un número creciente de publicaciones en este campo, tanto a nivel de experimentación como a nivel clínico.

La mayoría de los **estudios diseñados** en modelos animales de osteoporosis se han realizado en hembras ovariectomizadas. Esta técnica ocasiona una disminución del área trabecular en la metáfisis y un aumento del número de osteoclastos. **La orquidectomía**, ocasiona una disminución del área trabecular en la metáfisis con incremento del número de osteoclastos, pero adicionalmente reduce la formación perióstica en el hueso cortical. Por tanto, la aparición de efectos negativos sobre el hueso cortical es la principal diferencia en la fisiopatogénesis de la osteopenia inducida por la gonadectomía en machos y la que ocurre en las hembras por la misma causa. La Food and Drug Administration (F.D.A) Americana estableció en 1993 las recomendaciones sobre el desarrollo de modelos animales para el estudio de la osteoporosis, destacando la recomendación de usar animales que pierden hueso tras la orquidectomía para el estudio de la osteoporosis por hipogonadismo.

Existen modelos experimentales de osteoporosis en ratas machos que ya han sido validados en trabajos previos [Thomson DD et al, Erben RG et al]. Estos estudios han mostrado que la deficiencia de andrógenos inducida en ratas orquidectomizadas produce una pérdida de hueso trabecular que está, al menos de forma transitoria, asociada con una formación y resorción ósea incrementada. Reinhold et al. demostraron que la orquidectomía en ratas macho ancianas induce una sustancial pérdida de hueso trabecular en el

esqueleto axial y apendicular, y esta osteopenia se asocia con un incremento pronunciado y sostenido del recambio óseo. Estas ratas mostraban unos índices bioquímicos e histomorfométricos elevados de resorción ósea osteoclástica desde las dos semanas posteriores a la cirugía hasta los nueve meses post-cirugía. La ausencia de andrógenos quedaba por lo tanto relacionada con la presencia de osteopenia y un recambio óseo elevado en ratas ancianas, **demostrando de esta manera, que las ratas macho ancianas imitan muy bien las condiciones inducidas por la falta de andrógenos en hombres adultos**. A pesar de la presencia de estudios previos al respecto, nosotros incluimos un grupo control donde verificamos que acontecía lo anteriormente expuesto.

**Decidimos emplear la rata Wistar** ( *Rattus norvegicus* cepa Wistar) por ser esta una rata muy utilizada en experimentación animal. Se trata de una rata albina, de tamaño medio, dócil, fácil de manipular y su reproducción es constante a lo largo de todo el año. Su esperanza de vida es de 24 meses, y lo que es más importante para el objeto de nuestro estudio, el pico máximo de masa ósea en la rata macho, medido por densitometría, se produce entre los 9 y 12 meses de edad y cada ciclo de remodelado dura entre 30 y 40 días [Kimmel DB, Erben RG et al]. Los estudios previos que han empleado la rata orquidectomizada como modelo experimental partían de ratas más jóvenes [Garret IR et al, Recker RR et al, Watts NB et al, Chesnut CH et al, Dempster DW et al, Gomez Alonso et al, Sato M et al<sup>104-159</sup>] con una edad media de entre 3 y 6 meses, que son animales sexualmente maduros pero en crecimiento aún. En nuestro trabajo hemos partido de ratas de 9 meses de edad, que son ratas maduras con su etapa de crecimiento ya terminada. Estas

condiciones experimentales no se dan en estudios previos en los que se emplean ratas más jóvenes. La finalidad buscada era asemejar la situación metabólica de estas ratas con la de los humanos que sufren osteoporosis por depleción androgénica, permitiéndonos obtener en periodos cortos de tiempo, debido al rápido metabolismo de estos animales, resultados para los que necesitaríamos varios años si se utilizaran otras especies más longevas. Finalmente, otra de las ventajas que aporta el empleo de la rata es la posibilidad de obtener material óseo para la realización de test biomecánicos y estudios microarquitecturales que por evidentes motivos no podrían realizarse en estudios en humanos.

En relación a la **PTH**, existen dos formas farmacéuticas autorizadas para el tratamiento de la osteoporosis: PTH (1-84), también llamada PTH humana recombinante de cadena completa, y PTH (1-34), o teriparatida. Esta última es un fragmento de la PTH humana correspondiente a los 34 primeros aminoácidos del extremo N-terminal. Decidimos emplear este último principio activo porque ha demostrado resultados significativos en la reducción de la incidencia de fracturas vertebrales y no vertebrales en personas a diferencia de la PTH de cadena completa que sólo ha demostrado disminuir la incidencia de las vertebrales (estudio *pivotal*) [Greenspan S et al]. Por otro lado, con la finalidad de que nuestro modelo experimental se aproxime lo máximo posible a lo que acontece en el ser humano, hemos adaptado las dosis que se emplean en el mismo al peso de los animales. En general, en trabajos experimentales previos, las dosis de PTH administradas a los animales eran muy elevadas (40 µg/Kg, 80 µg/Kg) [Norman AW et al] en comparación con las utilizadas en estudios clínicos, que generalmente no sobrepasan los 2 µg/Kg [Gabet Y et al, Zhang

KQ]. En nuestro diseño experimental, se ha utilizado una dosis de PTH de 4  $\mu\text{g/Kg}$  basándonos en los buenos resultados obtenidos en estudios previos con el empleo de estas dosis mucho más cercanas a las administradas a humanos. Tezval y cols. estudiaron el efecto de 4  $\mu\text{g/Kg}$  de teriparatida administrados diariamente durante 5 semanas en ratones Sprague–Dawley adultos a las 12 semanas de la OQX, y Montero y cols. trataron ratas macho Wistar adultas con 4  $\mu\text{g/Kg}$  de teriparatida/día durante 10 semanas, iniciando el tratamiento a las 24 semanas de la castración. En ambos casos, teriparatida fue capaz de mejorar la pérdida de masa ósea inducida por el hipogonadismo en la región trocantérica. Creemos que con el empleo de estas dosis nuestros resultados reproducen de una manera más fiel lo que ocurre en el hombre al ser tratado con PTH [Johansson AG et al, Nyquist et al].

Otros factores importantes son el momento del inicio del tratamiento y la duración. En momento de inicio parece ser clave. En el trabajo de Stewart et al se comenzó el tratamiento con PTH un mes después de realizarse la castración, mientras que en nuestro trabajo las ratas permanecieron 6 meses orquidectomizadas, con lo que partíamos de una situación de osteopenia mucho más marcada. En el trabajo de Tsuchida et al los resultados mostraron que la recuperación de la conectividad trabecular al tratar ratas ovariectomizadas con PTH, era menor si el tratamiento se iniciaba tres meses después de la operación que si se iniciaba un mes después. Estos hallazgos condujeron a los autores a sugerir que debía existir un límite tras la depleción hormonal a partir del cual la conectividad trabecular no se recupera después de la administración de PTH; es decir, que el retraso en el tratamiento con PTH puede llevar a la no recuperación de la conectividad trabecular.

En cuanto a la **duración total del tratamiento**, en nuestro modelo se limitó a 10 semanas, siendo ésta la duración equivalente del tratamiento con péptidos osteoformadores en humanos (18- 24 meses), ya que es conocido que la aparición de cambios proliferativos descritos con el uso de péptidos de PTH en hueso se relacionan con la dosis empleada, pero también con la duración del tratamiento.

***El estudio del remodelado óseo puede realizarse mediante diversas técnicas*** como el ultrasonido, la radiología, la densitometría ósea, la histomorfometría ósea y los marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Las técnicas de imagen, radiología y densitometría ósea, son técnicas que nos informan del estado del hueso en un momento determinado, pero no revelan lo que está ocurriendo en ese mismo momento a nivel de los procesos formativos y resortivos del hueso. Este es el motivo por el que hemos considerado imprescindible emplear la histomorfometría ósea, y los marcadores bioquímicos que son técnicas que reflejan lo que está sucediendo a nivel del remodelado del hueso (formación/resorción) en el momento de su realización. Para observar cambios significativos con las técnicas de imagen es necesario que transcurra un tiempo mínimo de 6 meses o de un año, cuando ya se han producido variaciones cuantitativamente importantes. **Los marcadores**, sin embargo, permiten evaluar variaciones en tiempos mucho más cortos, como días e incluso horas. Por ello, resultan de gran utilidad cuando se quiere monitorizar la capacidad de respuesta a un determinado tratamiento. Además, reflejan el remodelado óseo en todo el esqueleto, tanto en hueso cortical como trabecular, permitiendo una evaluación continua del paciente a través de una simple muestra de sangre y/o orina.

En concreto, hemos empleado, la fosfatasa alcalina porque en ausencia de desordenes hepáticos además de proporcionar una buena impresión de la extensión de la formación de hueso nuevo y la actividad osteoblástica su determinación es muy sencilla y su coste especialmente bajo. Otro de los marcadores que hemos empleado, la Osteocalcina (BGP), aunque tradicionalmente se ha empleado como marcador bioquímico de formación ósea por ser la excreción al suero de parte de esta proteína directamente proporcional a la síntesis de la misma, debemos considerarla más como un marcador de remodelado óseo que como marcador de formación ósea [Díaz et al], dado que al producirse la resorción ósea, también pasa al suero parte de la BGP unida al hueso. Finalmente, otro de los marcadores que hemos empleado ha sido el Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX). La sensibilidad de este marcador para detectar cambios en la tasa de resorción parece ser muy grande, de acuerdo con trabajos publicados [Mann et al].

En relación a la medición de la Densidad Mineral Ósea (DMO) decidimos emplear la **Absorciometría Radiológica de Doble Energía** (DEXA), principalmente por dos razones. En primer lugar, su capacidad predictiva; la medición que proporciona sobre la DMO tiene una capacidad predictiva del desarrollo de una fractura comparable en magnitud a la que tiene la presión sanguínea en relación con el accidente vascular cerebral, y mejor que la del colesterol sérico para la enfermedad coronaria. En segundo lugar, la baja dosis de radiación recibida, su disponibilidad y facilidad en el empleo. Estas características hacen que sea una técnica ampliamente utilizada [Steiger et al].

Consideramos que para que el estudio del hueso sea completo y poder alcanzar los objetivos inicialmente planteados (determinar si el tratamiento con



PTH mejora la calidad ósea y no sólo la cantidad) la investigación de los parámetros estructurales del mismo es esencial. Para ello, empleamos estudios de histomorfometría ósea. La medida de forma rutinaria de estos parámetros en la práctica clínica no es factible aún, ya que no se encuentran aún disponibles técnicas no invasivas validadas para la evaluación clínica de estos aspectos de la calidad ósea.

La **evaluación histológica** es la técnica patrón oro que nos va a permitir evaluar con mayor exactitud y como un conjunto, a la masa ósea, la microarquitectura tisular y la actividad metabólica del hueso. Los dos primeros son parámetros fundamentalmente estáticos; por el contrario, en el tercero se cuantifica la actividad desarrollada en el hueso en un periodo de tiempo; es, por tanto, un parámetro dinámico que utiliza la captación de tetraciclinas como marcador de dicha actividad.

Finalmente para estudiar las **propiedades mecánicas del hueso**, decidimos emplear el **ensayo de torsión** en lugar del ensayo de flexo-extensión principalmente por dos motivos: Por un lado, porque las tensiones cortantes ocasionan la rotura del hueso en la zona más débil del mismo, repartiéndose la carga uniformemente en todas las secciones. Por otro lado, está descrito que la longitud y la orientación de la muestra ejercen poca influencia en el ensayo, anulando la anisotropía de la misma [Burstein et al], lo cual constituye una ventaja. Finalmente, estos ensayos son también los más idóneos para estudiar la influencia que ciertos tratamientos farmacológicos tienen sobre el hueso.

**Al evaluar los resultados** obtenidos en cuanto a la medición de los **marcadores bioquímicos** de remodelado óseo en nuestro estudio, pudimos observar que a los setenta y dos días tras la orquidectomía en las ratas macho se produjo un aumento significativo del remodelado, tanto a nivel de formación ósea que medimos mediante la osteocalcina (BGP) y la fosfatasa alcalina como a nivel de resorción, para lo cual utilizamos el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX). Este hecho está ampliamente documentado tanto en estudios en humanos como en modelos experimentales animales [Thomson DD et al, Food and Drug Administration: Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Washington DC: FDA Division of Metabolism and Endocrine Drug Products.1994]. Se conoce que la falta de hormonas sexuales actúa directamente aumentando la actividad osteoclástica, lo que provoca un aumento asociado de la actividad osteoblástica, pero con un balance desequilibrado y negativo respecto a la integridad del hueso [Erben RG et al]. El incremento de la resorción con respecto de la formación, por una parte conduce a un descenso de la DMO, lo que implica una mayor fragilidad. Por otra parte, este aumento del remodelado podría ser positivo en cuanto a que aumentaría la capacidad de reparación de microfracturas, pero esto sólo sucedería si la actividad formadora y destructiva estuvieran equilibradas, cosa que no ocurre en este caso. Transcurridos 6 y 8,5 meses desde la intervención quirúrgica, se siguió observando que las ratas orquidectomizadas tenían elevados los niveles de BGP, con niveles normales de CTX y niveles significativamente disminuidos de fosfatasa alcalina. Esto podría deberse a dos causas; por un lado, que la BGP sea un marcador de remodelado óseo más

sensible que el CTX para detectar los cambios producidos tras la orquidectomía; o bien, que el aumento de la resorción ósea sea mayor en el período inmediato a la orquidectomía y que se estabilice tras varios meses de depleción androgénica. Además, en principio la cantidad de BGP presente en suero sería proporcional a la cantidad de proteína sintetizada, pero al producirse la resorción ósea también pasa al suero parte de la BGP unida al hueso por lo que se debería considerar a la osteocalcina mas como un marcador de remodelado óseo que como marcador de formación. De hecho los niveles de BGP se mantienen elevados en todas las ratas orquidectomizadas. Con respecto a los bajos niveles de fosfatasa alcalina, no los hemos tenido en cuenta debido a la poca especificidad y sensibilidad de este marcador con respecto a la BGP.

La depleción androgénica debida a la orquidectomía provocó, como consecuencia directa del desequilibrio en el remodelado, alteraciones en la integridad del hueso, que aunque después de 72 días de la cirugía no fueron detectables, ni a nivel femoral ni en la columna, mediante la **técnica de DEXA**, sí lo fueron mediante **estudios histomorfométricos**. En estudios previos ya se había observado que el volumen trabecular (BV/TV) y el área trabecular son parámetros más sensibles que la densidad mineral ósea [NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy]. Sin embargo, al cabo de 6 meses de orquidectomía, la osteopenia es mucho más pronunciada y ya es observable tanto a nivel de DEXA en el fémur como de análisis histomorfométricos. Lo mismo sucede tras los 8,5 meses desde la intervención quirúrgica, pero en este caso el descenso de densidad mineral ósea medido por DEXA es sinificativo en ambas localizaciones, es decir, fémur

y columna. Resultados similares obtuvo Libouban H que sólo detectó diferencias significativas con DXA después del periodo más largo de 16 semanas. Esto es debido, como hemos mencionado anteriormente, posiblemente a la diferencia de sensibilidad del DXA frente a las técnicas histomorfométricas, las cuales son mucho más sensibles y además son capaces de detectar cambios en la arquitectura ósea muy pronto. Los datos obtenidos con DXA a los 6 y 8.5 meses son congruentes con los obtenidos por histomorfometría.

El desequilibrio en el remodelado debido a la falta de andrógenos produjo a los 72 días desde la orquidectomía un hueso marcadamente osteopénico, con unos valores de BV/TV significativamente menores que los de las ratas controles aunque no fue detectado por DXA hasta los 6 meses. Estos datos están en concordancia con otros estudios previos como el de Gabet Y et al en que las ratas orquidectomizadas ya presentaron valores disminuidos de BV/TV a las 6 semanas y fueron aún más marcados a las 12 semanas. En nuestro estudio obtuvimos valores de BV/TV significativamente disminuidos a los 6 y 8,5 meses desde la cirugía, ya que la pérdida ósea se mantiene en el tiempo tras la depleción hormonal. Es interesante destacar que en cuanto a la pérdida neta de trabéculas con respecto a las ratas SHAM, la obtenida a 72 días es similar a la observada tras 6 y 8,5 meses desde la orquidectomía. Esto parece indicar que la depleción androgénica produce un rápido aumento en la resorción ósea al poco tiempo de producirse la privación hormonal que luego se estabiliza. Es probable que un incremento en el remodelado óseo sea el evento más temprano que se produce tras la orquidectomía. Nuestros datos

están en consonancia con esta hipótesis, al igual que los publicados por Libouban H et al en que ya observó la disminución del número de trabéculas, medido por el Tb.Sp al igual que en nuestro estudio, a las 4 semanas. Este parámetro está muy relacionado con el tamaño de las cavidades medulares y es probable que la pérdida ósea estuviera asociada con las perforaciones trabeculares que incrementan la porosidad del hueso trabecular. Todo esto podría explicar la importante disminución de volumen trabecular óseo que se produce en un primer momento y que luego se estabiliza en nuestro estudio. En el trabajo de Gabet, se observó una disminución del número de trabéculas (Tb.N) a las 6 semanas del 38% que llegó a un 54% a las 12 semanas en las ratas orquidectomizadas, y estas cifras estaban en total consonancia con el aumento del espacio trabecular (Tb.Sp).

En nuestro trabajo se observó que el aumento del espacio trabecular (Sp.Tb) no iba acompañado de la disminución del grosor de las trabéculas (Tb.Th) a los 72 días tras la orquidectomía. En el estudio de Libouban H et al, el grosor trabecular no se vio afectado por la orquidectomía tras 16 semanas. Encontramos unos resultados similares también en un estudio publicado por Audran M et al. realizado en ratas Wistar en el que no se modifica el grosor trabecular tras 16 semanas desde la orquidectomía, pero el espacio trabecular se ve dramáticamente afectado por la orquidectomía a las 4 semanas. En todos los casos estudiados y a partir de los datos de espesor trabecular (Tb.Th) y separación entre trabéculas (Tb.Sp); se deduce que la disminución del volumen trabecular óseo (BV/TV) se debe a una mayor separación entre trabéculas provocada por la pérdida del número de trabéculas que hace que exista mayor espacio entre ellas, y a partir de los 6 meses de castración, también contribuye

a la disminución del volumen trabecular, la disminución del grosor trabecular. Todos estos cambios son más acusados a nivel de las metáfisis tibiales que a nivel vertebral, lo que indica que las metáfisis tibiales son de alto recambio óseo, hecho este bien conocido en ratas hembras, donde en situaciones de movilización rápida de calcio (rata embarazada o nodriza) las trabéculas metafisarias se evaporan. Por otra parte, el estudio morfométrico de las diáfisis tibiales en las ratas castradas muestra una modificación en la geometría del cilindro diafisario consistente en un aumento del área total pero manteniendo la cantidad de hueso aunque ésta se distribuye más periféricamente para mantener su eficacia y sólo después de los 8,5 meses de castración se puede notar una disminución en el grosor cortical.

La orquidectomía no provocó variaciones en las **propiedades biomecánicas** del hueso analizadas en este estudio, indicando alteraciones menores de la calidad ósea que las indicadas en otros trabajos tras la depleción estrogénica (Stewart AF et al). Es difícil concluir si estas variaciones entre la ovariectomía y la orquidectomía se deben a diferencias en el modo en que se afecta el remodelado óseo, o bien, a otra serie de factores intrínsecos ligados al sexo, que hacen que el hueso de los machos esté mejor defendido frente a una pérdida de masa ósea y a su consecuente aumento en el riesgo de fractura, que el de las hembras. Estas razones podrían deberse a diferencias en el tamaño, en la geometría o en la composición de la matriz. De hecho, en condiciones basales y partiendo de la misma edad, las ratas macho tienen una densidad mineral ósea mayor que las ratas hembra y el tamaño del esqueleto masculino es mayor que el de las hembras. Otra posible explicación la encontramos en nuestro estudio al analizar las diáfisis de las ratas

orquidectomizadas, donde se observa que el cilindro diafisario se agranda manteniendo la cantidad de hueso pero distribuida más alejada del centro de gravedad como una adaptación mecánica a la nueva situación.

***El tratamiento con PTH (1-34) inmediatamente después de la orquidectomía***, no produjo variaciones significativas en los **niveles de remodelado** observados en las ratas tratadas en relación con las ratas orquidectomizadas sin tratamiento, en ambos grupos estaba incrementado de forma similar. Los resultados fueron parecidos tanto a nivel de **marcadores de formación** (BGP y FA) como a nivel de marcadores de resorción (CTX); tanto en el grupo de ratas orquidectomizadas tratadas inmediatamente tras la cirugía, como en las no tratadas en que se tomaron los datos de marcadores a los 72 días tras la orquidectomía, aparecen los marcadores de formación y resorción significativamente aumentados frente a los controles con tendencia a ser mayores en las ratas tratadas. Sin embargo, en las ratas tratadas a los 6 meses de la cirugía solo se encontraban aumentados los marcadores de formación al igual que en las ratas sin tratar a los 6 y 8.5 meses.

Es necesario analizar los resultados obtenidos por **técnicas histomorfométricas** para poder deducir el balance positivo que se produce en el remodelado óseo tras el tratamiento con PTH. De hecho, el tratamiento con esta hormona inmediatamente después de la orquidectomía evitó la pérdida de trabéculas óseas inducida por la depleción androgénica, además dichas trabéculas mantuvieron su grosor. En el estudio de Gabet también se observó una reversión de los efectos de la orquidectomía sobre el número de trabéculas a las 12 semanas. Más aún, en nuestro estudio pudimos comprobar que las

ratas orquidectomizadas y tratadas inmediatamente con PTH llegaron a presentar, al cabo de los 72 días de tratamiento, unos niveles de densidad mineral ósea, en fémur y en columna, significativamente mayores que los de las ratas intactas de la misma edad.

El efecto del tratamiento preventivo con PTH consistió fundamentalmente en la conservación del número de trabéculas porque se evitó la desaparición de las mismas, que como sabemos es un efecto esperable ocasionado por la orquidectomía, como nos han mostrado los datos obtenidos en los grupos de ratas operadas y no tratadas de nuestro estudio y en otros estudios previos. Este efecto era observable tanto en la tibia como en las vertebrae lumbares. Como pudimos ver, la falta de andrógenos parece no afectar al grosor trabecular. En las ratas tratadas inmediatamente tras la orquidectomía podemos observar la existencia de una tendencia no significativa al engrosamiento de las trabéculas. Estas acciones sobre la calidad ósea producidas por la PTH (1-34) no causaron ninguna diferencia en las **propiedades biomecánicas** del hueso estudiadas en este trabajo, lo que puede indicar la ausencia de posibles efectos negativos del tratamiento sobre la fragilidad ósea.

***Cuando se trataron con PTH las ratas orquidectomizadas que habían alcanzado unos niveles significativos de osteopenia***, 6 meses después de la operación, se mantuvieron los **valores séricos** elevados de BGP, y los valores normales de CTX. El tratamiento con PTH a las ratas operadas se tradujo, en este caso, en un aumento del **grosor trabecular** (Tb.Th) hasta niveles que tienden a ser suprafisiológicos, aunque no de forma significativa, y a una recuperación parcial sin ser significativa tampoco, del número de



trabéculas (Tb.Sp). En un trabajo realizado en el 2005, Gabet y Col, observaron también mediante análisis de la tibia por tomografía axial computerizada ( $\mu$ CT), un incremento suprafisiológico del espesor trabecular y una marcada, aunque incompleta restauración del número de trabéculas al tratar con una dosis de 80  $\mu$ g/Kg/día a ratas de 13 semanas de edad, orquidectomizadas durante 6 semanas y tratadas con PTH durante otras 6 semanas. En otro estudio realizado por Oxlund y col con ratas macho de 24 meses de edad sanas, con una osteopenia muy grave debida a su avanzada edad, se observó que el tratamiento con PTH (62,5  $\mu$ g/Kg/día) durante 56 días, daba como resultado la formación, muy significativa estadísticamente, de hueso trabecular nuevo (BV/TV), tanto en su número (Tb.Sp) como en su grosor (Tb.Th). En conclusión podríamos afirmar que la PTH tiene un efecto marcado sobre el grosor trabecular, el cual, tras la pérdida provocada por la orquidectomía es restaurado por el tratamiento con PTH a niveles fisiológicos e incluso suprafisiológicos. El numero de trabéculas se restaura a niveles control pero sin significación estadística, al compararlo con los datos de espacio trabecular ,si obtenemos en el grupo de ratas tratadas un disminución significativa del mismo, hecho totalmente congruente con el aumento del numero de trabéculas. La disminución del espacio entre las trabéculas podría deberse también al aumento del grosor trabecular, pero como el grosor se revierte a niveles fisiológicos con cierta tendencia no significativa a alcanzar niveles suprafisiológicos podríamos pensar que la disminución de ese espacio es debido a la restauración del numero de trabéculas que había antes de someter a las ratas a la intervención quirúrgica.

Al igual que en el caso del tratamiento preventivo de la osteopenia inducida por la orquidectomía, el tratamiento curativo de la misma en las ratas orquidectomizadas durante 6 meses, no produjo ningún cambio en las **propiedades biomecánicas** después del ensayo de torsión del fémur de estos animales.

Los resultados de este trabajo sugieren que esta dosis de PTH es suficiente tanto para impedir el desarrollo de osteopenia después de la orquidectomía así como para revertir casi completamente los efectos causados por la falta de andrógenos (no se recupera totalmente ni el BV/TV, ni el número de trabéculas).

Es importante en este punto destacar el hecho de que la dosis de PTH utilizada en este trabajo, como hemos mencionado anteriormente, menor que la utilizada habitualmente en otros estudios experimentales y más cercana a la utilizada en hombres, no provocó en ningún caso estudiado variaciones en la determinación de **creatinina sérica**, indicando una correcta función renal en los animales. Del mismo modo, no produjo en ningún caso **hipercalcemia** en las ratas que recibieron tratamiento con PTH. Autores anteriores observaron hipercalcemia en las ratas bajo tratamiento con PTH así como en estudios clínicos [Keutman HT et al, Garret IR et al]. Dado que el grado de calcemia es uno de los factores determinantes del grado de mineralización del hueso, un exceso de calcio podría producir un aumento de la aposición del calcio en la matriz ósea que como es bien sabido conlleva un aumento de la rigidez del hueso, lo que constituiría un factor negativo sobre la fragilidad ósea haciendo al hueso más susceptible de sufrir fracturas. Como puede observarse en nuestros

resultados, no hemos encontrado diferencias significativas en este parámetro en ninguno de los grupos estudiados.

Para resumir, podríamos afirmar que los resultados obtenidos en este trabajo apoyan los obtenidos en trabajos previos en el sentido de que la orquidectomía produce alteraciones significativas sobre la calidad de hueso a nivel de remodelado, estructura trabecular y densidad mineral ósea. Sin embargo, en unas condiciones similares de edad y de tiempo tras la depleción de hormonas sexuales, estos cambios provocan variaciones significativas en propiedades biomecánicas del fémur de las ratas hembra (Stewart AF et al), pero de acuerdo con el presente trabajo la depleción de hormonas sexuales, no tienen consecuencias sobre dichas propiedades en el fémur de las ratas macho, indicando que la pérdida estrogénica tiene consecuencias más graves sobre la calidad del hueso que la falta de andrógenos. Una dosis de PTH de 4 µg/Kg/día administrada durante 72 días a ratas de 9 meses de edad inmediatamente después de la castración, es capaz de evitar los efectos negativos producidos por la orquidectomía sobre la calidad ósea. La misma dosis administrada a animales con la misma edad inicial y una marcada osteopenia tras 6 meses de orquidectomía, es capaz de revertir los efectos sobre la integridad del hueso en el caso de las ratas macho, aunque no totalmente. Estos resultados sugieren que es posible que exista un límite en cuanto a pérdida de integridad ósea en que el retraso en el tratamiento con PTH impide la recuperación de la conectividad trabecular, aunque no puede descartarse la posibilidad de obtener mejores resultados con dosis mayores y durante más tiempo de tratamiento.

Esta dosis de PTH, además, no produce efectos negativos en la calcemia ni en la rigidez intrínseca.

No se puede dejar de tener en cuenta el elevado número de pacientes con cáncer de próstata sometidos a terapia de depleción androgénica en el que se desarrolla un cuadro de osteopenia similar al expuesto en este trabajo, y candidatos por tanto a un tratamiento preventivo y/o curativo.

## VI. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y DIRECTRICES FUTURAS

---

## **Limitaciones del estudio**

Aunque este estudio proporciona información novedosa sobre el efecto de PTH (1-34) en un modelo experimental en rata macho, existen limitaciones evidentes a la hora de extrapolar los resultados a los humanos. A pesar de ello, creemos que este modelo experimental nos permite establecer las bases farmacológicas del estudio de los efectos de PTH (1-34) en la OP masculina, lo que resulta imprescindible antes de llevar a cabo estudios clínicos para valorar dichos efectos en pacientes varones.

## **Directrices Futuras**

Dado que la teriparatida está indicada en el tratamiento de la osteoporosis primaria del varón, quizás sería interesante diseñar estudios que valoren comparativamente la eficacia y seguridad de la PTH (1-34) frente a la forma completa PTH (1-84) en esta población de Pacientes.

## VII. CONCLUSIONES

---

## **7. CONCLUSIONES.**

1.- Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan los obtenidos en trabajos previos en el sentido de que la orquidectomía produce alteraciones significativas sobre la calidad del hueso disminuyendo la densidad mineral ósea medida por densitometría ósea, alterando en sentido negativo la estructura trabecular analizada por técnicas histomorfométricas en incrementando de modo significativo el remodelado óseo cuantificado a través de la osteocalcina y el telopéptido carboxiterminal del colágeno I.

2.- Como aportación original de este trabajo al estudio del efecto de la falta de andrógenos sobre el hueso podemos añadir que la castración en las ratas macho condiciona cambios óseos profundos desde un punto de vista morfológico, como:

- a. Alteración de la morfología y geometría de las vértebras y diáfisis con pérdida progresiva de masa trabecular y disminución del grosor trabecular.
- b. Readaptación mecánica a la nueva situación de pérdida de masa trabecular, con redistribución de la geometría del cilindro diafisario, de modo que las propiedades biomecánicas estudiadas del hueso de la rata orquidectomizada se mantienen similares a las de los animales controles.
- c. Incremento rápido de la tasa de recambio óseo y mayor porcentaje de superficie mineralizante que paulatinamente se va decelerando.



- d. Perturbación del mecanismo de mineralización normal en las superficies mineralizantes.

**3.-** Una dosis de PTH de 4 µg/Kg/día administrada durante 72 días a ratas de 9 meses de edad inmediatamente después de la castración, es capaz de evitar todos los efectos negativos, estudiados en el presente trabajo, producidos por la orquidectomía sobre la calidad ósea. Sin embargo, la misma dosis de PTH administrada a animales con la misma edad inicial y una marcada osteopenia tras 6 meses de orquidectomía, sólo es capaz de revertir los efectos sobre la integridad del hueso de modo parcial (Recuperación de la DMO), pero no totalmente de la estructura trabecular.

**4.-** Desde un punto de vista morfológico, los efectos del tratamiento de las ratas castradas con PTH se manifiesta como:

- a. Una mejora de la morfología y la geometría de las vértebras y diáfisis con aumento de la cantidad de hueso trabecular y cortical, y aumento del grosor individual de las trabéculas y espesor cortical.
- b. Una nueva redistribución de la masa ósea, que había sido recolocada tras la orquidectomía, y vuelve a condiciones geométricas de los animales controles.
- c. Aumento del número de lugares y de la eficacia de la mineralización como se puede deducir de los experimentos histomorfométricos realizados con tetraciclina y azul de metileno.

**5.-** Las diferencias observadas en la efectividad del tratamiento con PTH en el estudio preventivo y curativo podrían deberse a:

- a. La diferencia de tasa de recambio óseo inicial al principio de dichos tratamientos como se deduce del estudio con tetraciclinas (El tratamiento con PTH sería más efectivo al ser más elevado el remodelado).
- b. No puede descartarse que existe un límite en cuanto a pérdida de integridad ósea en que el retraso en el tratamiento con PTH impide la recuperación de la conectividad trabecular, ni tampoco la posibilidad de obtener mejores resultados con dosis mayores y durante más tiempo de tratamiento.

**6.-** Es importante destacar que esta dosis de PTH no produjo efectos negativos sobre la calcemia ni rigidez intrínseca.

**7.-** Aunque no se puede realizar una extrapolación directa de los resultados obtenidos en ratas a los humanos, estos modelos experimentales utilizados permiten profundizar en los mecanismos de degradación de la calidad ósea que se producen tras la depleción de hormonas sexuales masculinas, así como en la capacidad de reparación de estos desórdenes mediante el tratamiento con PTH y sugerir el empleo de dicho tratamiento, especialmente inmediatamente tras la pérdida androgénica para evitar el desarrollo de la osteopenia masculina.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abu EO, Horner A, Kusec V. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3493-3497.
2. Agnusdei D, Gerard D, Camporeale A, Martini G, Genari C. The european vertebral study in Siena, Italy. *Bone* 1994; 16 (1S): 118S.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds. *The Cell*. Nueva York: Garland Publishing Inc; 1994.
4. Aubin JE, Turksen K, Hersche JNM. Osteoblastic cell Lineage. En: Noda, M. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. San Diego: Academic Press Inc; 1993; pp.1-45.
5. Audran M, Chappard D, Legrand E, Libouban H, and Baslé MF. Bone microarchitecture and bone fragility in men: DXA and histomorphometry in humans and in the orchidectomized rat model. *Calcif Tissue Int* . 2001;69:214-217.
6. Bagatell cj, Bremner WJ. Androgens in men. Uses and abuses. *N Engl J Med* 1996; 334:707-714.
7. Bargsten G, Stanka P. Light and electron microscopic study on the osteoclastic phagocytosis of cells in the rat. *Anat Anz* 1985; 159: 13-20.
8. Baron R. Principios generales de la biología ósea. Capítulo 1. En: Favus MJ, Editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Barcelona: Medical Trends, 2005:1-9.
9. Blanch J, Pérez-Edo L, Ciria M, Benito P, Del Río L, Vila J. Hip fracture threshold in osteoporotic men. *J Bone Miner Res* 1997; 12 (S1): S379.

10. Burstein AH, Frankel VH. A standard test for laboratory animal bone. J Biomech. 1971. Mar; 4(2): 155-158.
11. Canalis E, Rydziel S, Delany AM, Varghese S, Jeffrey JJ. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. Endocrinology 1995; 136(4): 1348-1354.
12. Chesnut CH, Rosen CJ. Bone Quality Discussion Group. Reconsidering the effects of antiresorptive therapies in reducing osteoporotic fracture. J Bone Miner Res. 2001; 16: 2163-72.
13. Ciria M. Blanch J. Introducción a la osteoporosis del varón.  
In: Osteoporosis del varón.
14. Clover J, Dodds RA, Gowen M. Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclast in situ and in culture. J Cell Sci 1992; 103 (Pt 1): 267-271.
15. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal Human osteoblast-like cells. Proc Natl Acad sci USA 1989; 86(3): 854-857.
16. Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Conference report. Am J Med 1993; 94:646-650.
17. Cooper G, Campion C, Melton LJ III. Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. Osteoporosis Int 1992; 2: 285-289.

18. De la Piedra C, Traba ML, Dominguez C, Sosa M. New biochemical markers of bone resorption in the study of postmenopausal osteoporosis. *Clinica Chimica Acta* 1997; 265:225-234.
19. De la Piedra C. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. En : Rapado A, Díaz Curiel M, editores. *Manual práctico de osteoporosis en atención primaria*. Madrid: FHOEMO, 1996.
20. Dempster DW. The impact of bone turnover and bone-active agents on bone quality: Focus on the hip. *Osteoporos Int.* 2002;13:349-52..
21. Díaz Curiel M. Prevalencia de la osteoporosis densitométrica en la población española. En: Rhône-Poulenc Rorer, editores. *Nuevas fronteras en el estudio de la densidad ósea en la población española*. Madrid: Edimsa; 1996. pp.95-117.
22. Díaz Diego EM, Nacher M, Rapado A, Serrano S, Bosch J, Aubia J, et al. Immunoreactive osteocalcin forms in conditioned media from human osteoblast culture and in sera from healthy adult control subjects and patients with bone pathologies. *European J Clin Invest* 1998; 28: 48-58.
23. Díaz Martín MA, Martín I, Soldevilla MJ, Sanchez A, Lozoya B, Díaz A, et al. Estudio de la reactividad cruzada en la determinación de la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina por dos métodos : Tandem R-Ostase y Alkaphase-B, el primero un IRMA y el segundo un ELISA. *Rev Esp Enf Metab Óseas* 1995;4 (Supl A):21.
24. El Mardi AS, Katchburian MV, Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf

- and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 239-245.
25. Erben R G , Eberle J, Stahr K, Goldberg M. 2000 Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res*: 1085-1098.
  26. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. *Bone Histomorphometry*. Nueva York: Raven Press;1994.
  27. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241(4861): 84-86.
  28. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241:84-86.
  29. Favus MJ. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2ª edición. Nueva York : Raven Press; 1994.
  30. Finkelstein J, Klibanski A, Neer R, Greenspan S, Rosenthal D, Cowley W. Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1987; 106:354-361.
  31. Fleisch H. Bone structure and function: an overview. Lecture presented in Lyon, January 21-24, 2002. International Osteoporosis Foundation
  32. Food and Drug Administration: Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Washington DC: FDA Division of Metabolism and Endocrine Drug Products.1994.

33. Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 1996; 137:4058-4060.
34. Gabet Y, Kohavi D, Müller R, Chorev M and bab I. Intermittently administered parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss and structural impairment in orchidectomized adults rats. *Osteopor Int*; 2005;16:1876-1443.
35. Gala Paniagua J, D'az-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo Garcia M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Brit J Radiol* 1998; 71:754-758.
36. Gambert SR, Schultz BM, Hamdy RC. Osteoporosis. Clinical features, prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24:317-371.
37. Garret IR, Mundy GR. Relationship between interleukin-1 and prostaglandin in resorbing neonatal calvaria. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 789.
38. Gomez Alonso C, Diaz Curiel M, Hawkins Carranza F, Perez Cano R, Diez Perez A and a Multicenter Project for Research in Osteoporosis. Femoral bone mineral density, neck-shaft angle and mean femoral neck width as predictors of hip fracture in males and females. *Osteoporos Int*. 2000;11:714-20.
39. Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle age men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:1016-1025.



40. Greenspan S, Bone HG, Ettinger MP. Effect of Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-84) on Vertebral Fracture and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *Ann Intern Med*. 2007; 146:326-339
41. Guinot M, Editor. Osteoporosis postmenopausal. Ed: Editorial Glosa, Barcelona 2007.
42. Guo CY, Jones TH, Eastell R. Treatment of isolated hypogonadotropic Hypogonadism effect on bone mineral density and bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:658-665.
43. Jackson JA, Riggs MW, Spiekerman AM. Testosterone deficiency as a risk factor for hip fractures in men: a case-control study. *Am J Med Sci* 1992; 304(1): 4-8.
44. Jackson JA, Kleerekoper M. Osteoporosis in men: diagnosis, pathophysiology, and prevention. *Medicine (Baltimore)* 1990; 69(3): 137-152.
45. Jackson JA, Kleerekoper M, Parfitt AM. Symptomatic osteoporosis in a man with hyperprolactinemic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1986; 105:543-545.
46. Johansson AG, Eriksen EF, Kindh E, Langdahl B, Blum WF, Lindahl A, Ljunggren O, Ljunghall S. Reduced serum levels of the growth hormone-dependant insulin-like growth factor binding protein and a negative bone balance at the level of individual remodeling units in idiopathic osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 82(9):2795-2798.

47. Karlsson MK, Johnell O, Nilson BE, Sernbo I, Obrant KJ. Bone mineral mass in hip fracture patients. *Bone* 1993; 14: 161-165.
48. Kasperk C, Helmboldt A, Borcsok I, Heuthe S, Cloos O, Niethard F, Ziegler R. Skeletal site-dependent expression of the androgen receptor in human osteoblastic cell population. *Calcif Tissue Int* 1997; 61:464-473.
49. Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 1989; 124(3):1576-1578.
50. Keutmann HT, Griscom AW, Nussbaum SR, Reiner BF, Goud AN, Potts JT Jr and Rosenblatt M. Rat parathyroid hormone (1-34) fragment: renal adenylate cyclase activity and receptor binding properties in vitro. *Endocrinology* 1985; 117(3):1230-34.
51. Kimmel DB. In vivo animal models in osteoporosis research. En Marcus R (Editors). *Osteoporosis Blackwell Scientific publications*. Boston 1994:354-382.
52. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273(5275):663-666.
53. Lea CK, Flanagan AM. Ovarian androgens protect against bone loss in rats made estrogen deficient by treatment with ICI 182,780. *Endocrinol* 1999; 160(1):111-117.

54. Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, Leonard MB, Bishop NJ, Bianchi ML, Kalkwarf HJ, Langman CB, Plotkin H, Rauch F, Zemel BS, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Silverman S. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. *Bone* 2008; 43(6): 1115-1121.
55. Libouban H, Moureau MF, Legrand E, Audran M, Baslé MF and Chappard D. Comparison of Histomorphometric descriptors of bone architecture with dual-energy X-ray absorciometry for assessing bone los in the orchidectomized rat. *Osteoporos Int* (2002) 13:422-428.
56. Malluche HH, FaugereMC, Bone Cells. En: *Atlas of Mineralized Bone Histology*, Malluche FF, Fauger MC , eds. Karger: New York; 1986.pp 4-9.
57. Mann V, Ralston SH. Meta-analysus of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 2003;32:711-7.
58. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and impli- cations for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21:115- 137.
59. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 1996; 312(7041): 1254-1259.
60. Melton LJ and Riggs BL. Espectro clinico. En riggs BL and Melton LJ (Editors). Raven Press.1988:171-198.

61. Montero M, Serfati D, Luna S. The effectiveness of intermittent rat parathyroid hormone (1-34) treatment on low bone mass due to oestrogen or androgen depletion in skeletally mature rats. *Aging Male* 2010; 13:59–73.
62. Navarro Quilis A. Epidemiología de la osteoporosis y de las fracturas en el anciano. En: Resúmenes Curso “Fracturas en el anciano” Cap 1 págs: 1-5. Barcelona, abril 2000.
63. NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001, 285: 785-795
64. Nogués X, Editor. Formadores de hueso. Barcelona: Scientific Communication Management, 2005
65. Norman AW, Litwack G. Steroid hormones: chemistry, biosynthesis, and metabolism. *Hormones*. California: Academic Press, 1997:49-86.
66. Nyquist F, Gardsell P, Jeppsson JO, Johnell O. Assessment of sex hormones and bone mineral density in relation to occurrence of fracture in men: a prospective population-based study. *Bone* 1998;22(2): 147-151.
67. Orwoll ES, Bliziotes M. Heterogeneity in osteoporosis. Men versus women. *Rheum Dis Clin N Am* 1994; 20: 671-689.
68. Oxlund H, Dalstra M, Ejersted C, Andreassen TT. Parathyroid hormone induces formation of new cancellous bone with substantial mechanical strength at a site where it had disappeared in old rats. *Eur J Endocrinol* 2002, 146: 43.1 – 8

69. Parfitt AM, Mathews CHE, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationship between surface, volume and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis : Implications of the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. J Clin Invest 1983;72:1396-1409.
70. Pfeilschfter J, Likhuf F, Müller-Beckman B, Blum WF, Pfister T, Ziegler R. Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor I and transforming growth factor  $\beta$ 1 in rat bone. J Clin Invest 1995; 96: 767-774.
71. Postel-Vinay MC, Kelly PA. Growth hormone receptor signalling. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1996; 10:323-336.
72. Ranz LG. Mechanisms and regulation of bone resorption by osteoclastic cells. En: Coe FL, Favus J, eds. Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Nueva York: Raven Press; 1992. pp.287-311.
73. Rapado A. Epidemiologic of osteoporosis in Spain-Bone. Vol 29- nº 3. Sept. 2001: 294-313.
74. Ray Fr, Chan JK Thamer. Medical Expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the U.S in 1995. J Bone Mineral Research 1997;12 (1) 24-35.
75. Recker RR. Embriology, anatomy and microestructure of bone. En: Coe FL Favus MJ,eds. Disorders of Bone and Mineral Metabolism. New York:Raven Press; 1992.pp 219-240

76. Reginster Jean Yves. The osteoporosis paradox. Raport 2 and International meeting on social Et Economic aspects of osteoporosis Et bone Disease. Liege. Belgium, december 2000.
77. Riancho JA y González Macías J. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Capítulo 7. En: Jarpyo Editores, S.A. 2004. ISBN: 84-88992- 91-2
78. Riggs B L, Melton L J IIIrd Medical progress series: Involutional osteoporosis. N Engl J Med 1986; 314: 1676-1686.
79. Robert L. Jilka. Molecular and celular mechanisms of anabolic effect of intemittent PTH. Bone 40 (2007) 1434-1446.
80. Rossert J, Terraz C, Dupont S. Regulation of type I collagen genes expression. Nephrol Dial Transplant 2000; 15 (suppl 6):66-68.
81. Sato M, Westmore M, Ma YL, et al. Teriparatide [ PTH (1-34)] strenghtens the proximal femur of ovaectomized nonhuman primates despite increasing porosity. J Bone Miner Res. 2004;19:623-9.
82. Schapira D, Lotan-Miller R, Barzilai D and Silbrmann m. the rat as a model for studies of the aging skeleton. Cells materials 1991;1:181-188.
83. Schenk RK, Attila J.Olah and Herrmann W. Preparation of calcified tissues for light microscopy. En: Glenn R. Dickson (editor). Methods of Calcified Tissue Preparation.1994.Elsevier.
84. Seeman E. The dilemma of osteoporosis in men. Am J Med 1995; 98: 2A 76 S-2A 88S.

85. Serrano Figueras S, Mariñoso Barba ML. Histomorfometría ósea. En: Serrano S, Aubia J, Mariñoso ML, editors. Patología ósea metabólica. Barcelona: Ediciones Doyma S.A; 1990: 77-89.
86. Simon D, Preziosi p, Barret-Connor E, roger M, Saint-Paul M, Nahoul K, Papoz L. The influence of aging on plasma sex hormones in men: the Telecom Study. Am J Epidemiol 1992; 135:783-791.
87. N, Baron R. Bone Cells and their function. En Canalis E, editor. Skeletal Growth Factors. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins,2000:1-16.
88. Steiger P. Standardization of measurements for assessing BMD by DXA. Calcif Tissue Int 195; 57: 469.
89. Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. J Bone Miner Res 2000, 15: 1517 – 25.
90. Tenover J. effects of testosterone supplementation in the aging male. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:1092-1096.
91. Tezval et al. Effect of parathyroid hormone on hypogonadism induced bone loss of proximal femur of orchietomized rat. World J Urol, 2011 Feb 5 pub ahead to print DOI 10.1007/s00345-011-0652-9.
92. Thompson D D, Simmons H A, Pirie C M, Ke H Z. 1995 FDA guidelines and animal models for osteoporosis. Bone 17, 125S-133S.

93. Tsitouras PD, Bulat T. Endocrine aspects of aging. The aging male reproductive system. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24:297-315.
94. Tsuchida T, Miyakoshi N, Kudo T, Tamura Y, Kasukawa Y, Suzuki K, et al. Restoring effect of human parathyroid hormone (1-34) on trabecular connectivity in ovariectomized rats. *Tohoku J Exp Med*. 2001;194:213-21.
95. Turb  C .Osteoporosis en un varon con hipogonadismo hiperprolactin mico. *Revista Española de Enfermedades Metabolicas  seas* 1996; 5: 17-19.
96. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14:595 608.
97. Vanderschueren D, Bouillon R. Androgens and bone. *Calcif Tissue Int* 1995;56(5):341-346.
98. Vanderschueren D, Van Herck E, Suiker AM, Visser WJ, Schot LP, Bouillon R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology* 1992; 130(5): 2906-2916.
99. Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, SteerB, Hodsman. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 1995;16:357-365.
100. Watts NB. Bone quality: Getting closer to a definition. *J Bone Miner Res*. 2002; 17:1148-50.



- 101.WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser 1994; 843:1-129.
- 102.Wiktorowitch et al. Economic implications of hip fracture: Health Service Use. Institutional care and cost in Canada. Osteoporosis Int 2001; 12: 271-278.
- 103.World Health Organization Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva: WHO Tech Rep. Ser 1994; 843: 1-129.
- 104.Zhang KQ, Chen JW, Li GF, Tian XY, Huang LF, Bao LH, Wang ML. Effect of intermittent injection of recombinant human parathyroid hormone on bone histomorphometry of ovariectomized rats. Acta Pharmacol Sin 2002, 23(7): 659 – 662.

# ANEXO

---

Parte de esta tesis doctoral ha sido publicada en el trabajo que se presenta a continuación.

## The effectiveness of intermittent rat parathyroid hormone (1-34) treatment on low bone mass due to oestrogen or androgen depletion in skeletally mature rats

M. MONTERO<sup>1</sup>, D. SERFATI<sup>2</sup>, S. LUNA<sup>3</sup>, M. DÍAZ-CURIEL<sup>4</sup>, M. T. CARRASCAL<sup>5</sup>, S. GOMEZ<sup>6</sup>, & C. DE LA PIEDRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioquímica Investigación, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Cirugía Ortopédica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Departamento de Enfermería y Fisioterapia, Cádiz University, Cádiz, Spain, <sup>4</sup>Medicina Interna, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, <sup>5</sup>Departamento de Mecánica, ETS Ingenieros Industriales, UNED, Madrid, Spain, and <sup>6</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Cádiz University, Cádiz, Spain

(Received 5 August 2009; revised 27 October 2009; accepted 2 November 2009)

### Abstract

Rat parathyroid hormone (PTH) 1-34 (4 µg/kg/day) was applied for 2.5 months to 9 month-old rats immediately after ovariectomy or orchidectomy or to 15 month-old rats with low bone mass which had been castrated 6 months before in order to know the effects on serum biochemistry parameters, lumbar and femoral bone mineral density, histology, cancellous and cortical bone histomorphometry, mineralisation content profile in cortical bone by backscattered-electron microscopy, and femoral torsion biomechanical testing. In ovariectomised rats, preventive PTH treatment avoided cancellous bone loss in tibial metaphysis and partially in lumbar vertebra, while in cortical bone, PTH increased endosteal resorption and periosteal formation. In intervention study, PTH did not restore cancellous bone but a strong endosteal and periosteal new bone formation was detected. In orchidectomised rats, PTH, in preventive study, avoided cancellous bone loss in metaphysis and lumbar vertebra, and a mild new bone formation in cortical bone was found. In intervention study, PTH maintained baseline cancellous bone mass, but in cortical bone a strong endosteal and periosteal new bone formation was detected. The PTH-induced new bone formation was confirmed by histology and by mineral content profiles. After castration, biomechanical properties were affected in females but not in male rats and PTH reverted this effect.

**Keywords:** Rat, parathyroid hormone, ovariectomy, orchidectomy, low bone mass

### Introduction

The fall in oestrogen levels after menopause leads to a decrease in bone mass as well as an increase in fracture risk. Likewise, androgen withdrawal also leads to a decrease in bone mass [1,2]. The analysis of results after clinical use of several kinds of osteoporosis-treatment drugs showed that a greater increase in bone mass was not always related to a decrease in fracture risk [3].

Recently, the definition of osteoporosis was reviewed and changed, introducing bone quality concept and bone mass concept together [4]. It is currently accepted that increase in bone fragility, i.e., fracture risk, is closely associated with bone quality [5]. Bone quality includes several parameters as bone turnover, bone mass, size and geometry, bone microarchitecture, mineralisation and organic matrix

composition as well as microfracture reparation capacity [6]. Given the critical role of these factors for bone deterioration, it is essential to understand how they are influenced by therapeutic agents.

Drugs used for prevention and treatment of both post-menopausal and androgen-withdrawal osteoporosis can be classified in three main groups: resorption inhibitors like calcitonin [7]; raloxifene [8] and bisphosphonates [9–11], bone formation stimulators like parathyroid hormone [12]; and those supposed to produce both effects simultaneously, like strontium ranelate [13]. All these treatment drugs produce significant decreases in fracture risk. However, more studies addressing the effects of these therapies on bone quality are required. A recent work by Kleerekoper [14] reviewed the currently-known aspects related to how osteoporosis therapies impact parameters of bone strength and quality.

Parathyroid hormone (PTH) is an anabolic agent when it is administered intermittently for osteoporosis [15]. PTH exerts its actions directly on osteoblasts implementing its activity on bone mineralising surfaces [16,17]. The 34-amino-acid fragment PTH (1-34) has shown to increase bone mass in humans as well as reducing the risk of fracture and is now available for treatment of patients with established osteoporosis and high risk of fracture [18]. However, it is not fully known how this treatment affects some parameters involved in bone quality.

The aims of this work were: (1) To study comparatively the effects produced by oestrogen or androgen depletion in some bone quality parameters such as bone mass measured by double energy X-ray densitometry (DEXA); bone microarchitecture quantified by histomorphometry; bone mineral distribution by backscattering electron microscopy and biomechanical properties of bone through torsion tests. Bone remodelling variations due to oestrogen/androgen lack were also analysed by biochemical markers of bone resorption and formation given that bone turnover is directly involved in bone tissue mineralisation and in microfracture repair [19,20]; (2) To study the effects of intermittent (1-34) rat PTH-treatment on these same parameters both in female and in male castrated rats at preventive and treatment level. This study has been performed using widely validated experimental models, *viz.*, ovariectomised and orchidectomised rats [21,22].

## Methods

### Animals

Ninety-two female (F) and 102 male (M) Wistar rats, 9 months old, weighing  $354 \pm 66$  g and  $523 \pm 74$  g

(mean  $\pm$  SD), respectively, at the start of the study, were used. At this age, rats were sexually mature and fully grown animals were then ovariectomised, orchidectomised or sham-operated (SHAM) under Ketamine (40 mg/kg, Ketolar, Bayer) and Xilacine (8 mg/kg, Rompún, Parke-Davis, Pfizer), and distributed into two studies. The animals were kept under constant living conditions (22°C, 12 h per day light-dark cycles), and food (standard Laboratory chow) and water were available *ad libitum*. Two studies were performed: prevention of ovariectomy- or orchidectomy-induced bone loss (study A), and treatment of ovariectomy- or orchidectomy-induced osteopenia (study B).

**Study A (prevention):** Thirty female and 40 male rats were randomised in the following groups: SHAM groups (SHAMF  $n=10$  and SHAMM  $n=15$ ) treated with vehicle for 2.5 months; castrated groups (OVX  $n=10$  and ORX  $n=12$ ) treated also with vehicle for 2.5 months; and castrated groups treated with PTH for 2.5 months (OVX + PTH  $n=10$  and ORX + PTH  $n=13$ ). Treatment in this study was started immediately after surgery. Rats were killed at the end of this treatment (Figure 1).

**Study B (intervention):** Sixty-two female and 62 male rats were randomised in the following groups: SHAM groups killed 6 months after simulated surgery (SHAMF1  $n=12$  and SHAMM1  $n=11$ ); castrated groups killed 6 months after ovariectomy or orchidectomy (OVX1  $n=12$  and ORX1  $n=11$ ); SHAM groups treated with vehicle for 2.5 months starting 6 months after simulated surgery (SHAMF2  $n=16$  and SHAMM2  $n=10$ ); castrated groups treated with vehicle for 2.5 months starting 6 months after surgery (OVX2  $n=10$  and ORX2  $n=15$ ); and, finally, castrated groups treated with PTH for 2.5 months starting 6 months after surgery

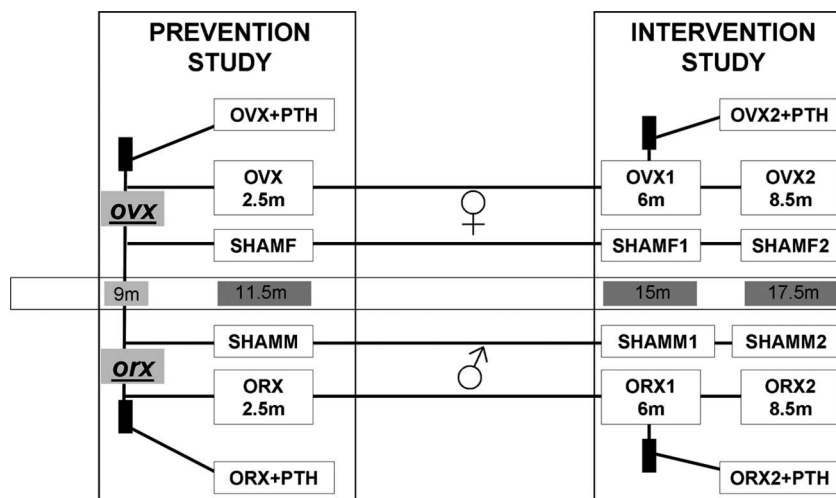


Figure 1. Design of the experimental study. The effects of rat-PTH treatment, at daily doses of 4  $\mu$ g/kg, were studied in female and male rats under two different conditions. In prevention experiment (study A) recently ovariectomised or orchidectomised rats were treated with PTH for 2.5 months (groups OVX/ORX + PTH). These rats were sacrificed at 11 months old with their paired SHAMF/SHAMM and OVX/ORX groups. In intervention experiment (study B) rats that were ovariectomised or orchidectomised 6 months before, and were treated with PTH for 2.5 months (groups OVX2/ORX 2 + PTH). In study B, groups of 15-month-old rats SHAMF1/SHAMM 1 and OVX1/ORX1 were sacrificed as baseline groups for the final 18.5-month-old rat groups SHAMF2/SHAMM2 and OVX2/ORX2.

(OVX2 + PTH  $n = 12$  and ORX2 + PTH  $n = 15$ ) (Figure 1).

Rat PTH (1-34) was obtained as a characterised or certified drug from Sigma-Aldrich Laboratories, Germany. PTH was dissolved in albumin in acetic glacial acid solution (0.1%); it was aliquoted, lyophilised and stored at 4°C until used. The day of its use, the corresponding lyophilised aliquot was dissolved in sterile saline solution as an administration vehicle. Rats received daily subcutaneous doses of PTH at a dose of 4 µg/kg/day or vehicle, starting the day after surgery (study A), or 6 months after surgery (study B).

On the day following the last day of treatment, the experimental animals were killed by exsanguination under ether anaesthesia. Blood samples were obtained by cardiac puncture and serum samples were immediately frozen at -80°C as aliquots for measuring markers of bone turnover and biochemical parameters. Once the blood was collected, lumbar vertebra and the two tibias of some animals were extracted for bone histomorphometry studies as will be detailed below. Right femurs of these rats were also extracted for mechanical tests. The rest of the animals were frozen at -20°C until bone mineral density (BMD) determination was performed. Animals were thawed at 4°C 2 days before BMD measurement.

All procedures were carried out in accordance with European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals.

#### Biochemical parameters

Serum creatinine levels were measured using an autoanalyser method (modular Roche DDPP). Sensitivity of this method was 0.1 mg/dl. Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were <0.7% and <2.3%, respectively.

Serum calcium levels were measured using an autoanalyser method (modular Roche DDPP). Sensitivity of this method was 0.2 mg/dl. Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were <0.9% and <1.5%, respectively.

#### Biochemical markers of bone turnover

Serum C-telopeptide of type I collagen (CTX) was measured by an ELISA specific for rat CTX (RatLaps ELISA, Nordic biosciences, Denmark). Sensitivity of the assay was 2.0 ng/ml. Intra- and inter-assay variation coefficients of the method were <5.6% and <10.5%, respectively.

Serum Bone Gla Protein (BGP) was measured by an immunoradiometric assay (IRMA) for the specific quantitative determination of rat osteocalcin levels (Rat Osteocalcin IRMA kit, Immutopics, San Clemente, CA). Sensitivity of this assay was 0.01 ng/ml. Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were <2.0% and <2.3%, respectively.

Serum alkaline phosphatase (ALP) was determined using an autoanalyser method (modular Roche DDPP). Sensitivity of this method was 1 UI. Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were <0.67% and <0.67%, respectively.

#### Bone mineral density

Bone mineral density was determined *in situ* in the lumbar spine (L2, L3 and L4) and in the whole left femur by DEXA using a HOLOGIC QDR-1000 TM (S/N 277) (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA) with small-animal software [23]. Previously, the whole left femur was extracted and cleaned of adjacent tissue. Intra-assay and inter-assay variation coefficients were <0.53% and <1.2%, respectively. The scans of the femur were analysed for BMD of the whole femur and the scans of the L2, L3 and L4 vertebrae were analysed for BMD of the whole three vertebrae and results were expressed as the mean of the values obtained.

#### Bone histology and histomorphometry

Lumbar vertebrae and tibias were isolated and fixed in neutral formol for 24h at 4°C. Lumbar vertebrae (L4) were embedded, undecalcified, in glycol-methacrylate/methyl-methacrylate (1:1). Serial sections (2.5 µm thick) were cut in the medial plane with a heavy-duty microtome (Microm HM360, Germany) by using 8-mm-length diamond knives (Diatome, Switzerland), and stained with toluidine blue or with von Kossa. In tibias, metaphyseal cancellous bone was studied using stereoscopic zoom microscopy (Nikon SMZ1500, Japan). For that, metaphysis was sawed into 500-µm thick sections by using a linear precision saw (Buehler Isomet 4000, USA) equipped with a 15LC diamond wafering blade. Sawed sections were rendered anorganic by sodium hypochlorite treatment. For tibia cortical bone studies, samples of tibia diaphysis, next to fibula junction, were embedded undecalcified in poly methyl-metacrylate. Two ground sections, 100 µm thick, were prepared by using a grinding-polishing machine (Buehler Phoenix Beta, USA) and stained with toluidine blue or with von Kossa.

Bone histomorphometry was performed in von Kossa-stained sections from vertebra and tibia diaphysis, and from anorganic tibia metaphysis sections. All sections were digitalised by using an optical scanner (HP scanjet 8200, USA) at 9600pp resolution (pixel size = 2.6 µm) [24]. Digital images were converted in a 1-bit black/white image after thresholding with the Image J (NIH, USA) programme (Figure 2). This image was used first to calculate bone areas and bone perimeters by pixel counting. Then structural indices such as cancellous bone volume BA/TA (%), trabecular thickness Tb.Th (µm), separation Tb.Sp (µm), and number Tb.N (n°/mm) for lumbar vertebra; apparent bone



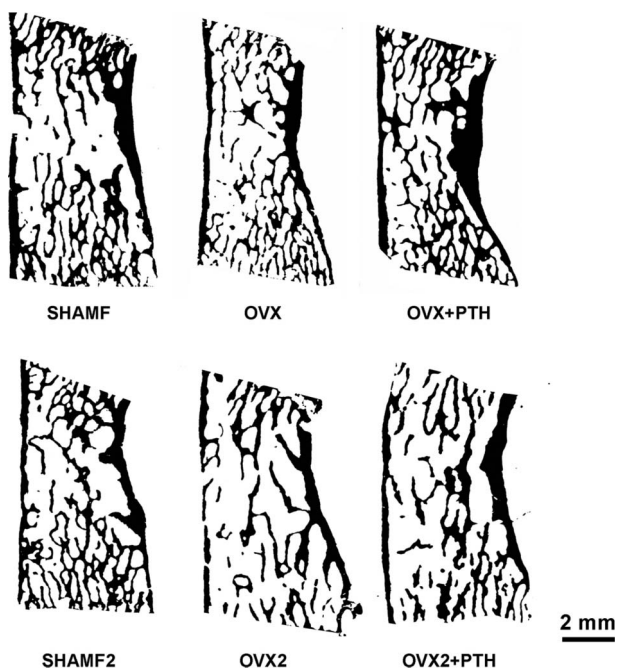


Figure 2. Examples of 1 bit black/white threshold images used for bone histomorphometry. Original digital images were obtained from 2.5  $\mu\text{m}$ -thick sections of lumbar vertebra (L4) stained with von Kossa by using an optical scanner at 9600pp resolution (pixel size = 2.6  $\mu\text{m}$ ).

trabecular area ( $\text{mm}^2$ ) for tibia metaphysis, and cortical bone tissue area ( $\text{mm}^2$ ), medullar bone area ( $\text{mm}^2$ ) and cortical thickness ( $\mu\text{m}$ ) for tibia diaphysis were determined in all groups.

#### Bone mineral content profile

Bone mineral content profile was determined only in study B where changes in total bone mineralisation degree were expected to occur after a long period of oestrogen or androgen depletion. Femurs from female rats and tibias from male rats were embedded in poly methyl-methacrylate. Single blocks were sawed transversally, and further trimmed and re-embedded together in such a way that blocks containing femurs (four femurs each group) or tibias (four tibias each group) were done. The blocks were cut plane parallel with a linear precision saw (Buehler Isomet 4000, USA) and the block surface containing bone was then diamond-polished. Carbon-coated blocks were observed under a scanning electron microscope (FEI Quanta 200, The Netherlands) fitted with a solid-state backscattering detector. The microscope was operated under high pressure at 20 kV, 35  $\mu\text{A}$  probe current and a working distance adjusted to 10.1 mm. All femurs were scanned ( $50\times$  magnification) in the same session to have equal contrast and brightness detection. Tibias were scanned at  $60\times$  magnification. Mineral profiles were measured as mean grey levels, grouped in 16 bins, and results expressed as percent cortical mineralised bone in each bin/total cortical mineralised bone [25].

Grey-level images were also processed by the Image J (NIH, USA) to display colour-coded mineralisation maps [26].

#### Biomechanical testing

The right femur of the animals was cleaned of adjacent tissue and the biomechanical test was performed. The mechanical test involved low-rate torsion ( $10^\circ/\text{min}$ ). A Schenk-Trebel RTP 0.6 model electromechanical testing machine was used with an M1602 digital indicator (Schenk-Trebel, Germany). A high-definition sensor was fitted to the machine in order to measure torque in a nominal range of  $<2$  Nm. A torque-angle turned curve was obtained for each femur. From this curve, the following information was obtained in each test: maximum value of the torque until fracture; angular deformation for the value of the maximum torque; stiffness of the sample calculated as the slope of the torque-angle turned curve measured by interpolation between points corresponding to 10–50% of the angular deformation of maximum torque (elastic zone), and absorbed energy until fracture.

#### Statistical analyses

The results of the experiments were expressed as the mean  $\pm$  SD of the different parameters. A non-parametric method, Mann–Whitney test (Medcalc Software Program, Belgium), was used to compare the different treatment groups. A  $p$  value  $<0.05$  was accepted as denoting a significant difference.

## Results

#### Biochemical parameters

Parathyroid hormone treatment did not modify creatinine levels in any studied group. Creatinine values were maintained between 0.44 mg/dl and 0.58 mg/dl. Calcemia was maintained in normal range (between 10.09 and 10.78 mg/dl) in all groups throughout the study.

#### Bone remodelling biochemical markers

**Females.** Table I shows that a significant increase was produced in bone remodelling at resorption level (CTX) and at formation level (BGP, ALP) 2.5 months after ovariectomy (OVX group).

This increase in bone remodelling was maintained in rats with an established low bone mass 6 months after ovariectomy; 8.5 months after ovariectomy only BGP and ALP maintained their increase, while CTX did not.

PTH treatment administered immediately after ovariectomy (OVX + PTH) maintained increased levels of bone formation markers (BGP and ALP). These levels were significantly higher than those of

the SHAM group (SHAMF) and not significantly higher than those of the OVX group (OVX). CTX levels stayed increased in ovariectomised rats in preventive treatment (OVX + PTH), being even higher than those of the OVX group without any treatment (OVX). However, PTH did not modify CTX values when rats with an induced osteopenia were treated (OVX2 + PTH). BGP and ALP levels in this group (OVX2 + PTH) were increased with respect to the SHAMF2 group.

**Males.** Table I shows a significant increase in bone remodelling both in bone resorption (CTX) and in bone formation (BGP, ALP), 2.5 months after orchidectomy (ORX). This increase, however, was only maintained for BGP after 6 (ORX1) and 8.5 months (ORX2) from surgery. CTX levels were similar in ORX1 (6 months after surgery) and ORX2 (8.5 months after surgery) to SHAMM1 and SHAMM2 groups, respectively. ALP levels of ORX1 were not different from those of SHAMM1, 6 months after surgery. However, ALP in ORX2 group was significantly decreased with respect to their control group (SHAMM2).

Parathyroid hormone treatment immediately after orchidectomy for 2.5 months (ORX + PTH) maintained the significant increase in bone remodelling (BGP, ALP, CTX) with respect to control

rats (SHAMM) and with a tendency, although without significance, to be even higher than that of orchidectomised animals without treatment (ORX).

Parathyroid hormone treatment to rats orchidectomised 6 months previously (ORX2 + PTH) did not increase bone resorption (CTX) level with respect to ORX2 or SHAMM2 groups. BGP was elevated with respect to SHAMM2, but levels were similar to their paired ORX2 rats. On the contrary, ALP levels were similar to those of the ORX2 and lower than those of SHAMM2 groups.

#### Bone mineral density

**Females.** Table II shows femoral BMD (FBMD) and lumbar BMD (LBMD) measured by DEXA in rats of the prevention and treatment groups.

No significant differences in femoral or lumbar BMD were found between OVX and SHAM groups 2.5 months after ovariectomy (OVX group). However, these parameters were significantly decreased in rats that were sacrificed 6 months after ovariectomy (OVX1) and 8.5 months after ovariectomy (OVX2) with respect to their age-matched SHAM group (SHAMF1 and SHAMF2).

Parathyroid hormone treatment for 2.5 months starting immediately after ovariectomy (OVX +

Table I. Biochemical markers of bone turnover.

	Females			Males		
	Bone resorption marker CTX (ng/ml)	Bone formation markers		Bone resorption marker CTX (ng/ml)	Bone formation markers	
		BGP (ng/ml)	ALP (IU)		BGP (ng/ml)	ALP (IU)
SHAMF/SHAMM	6.64 ± 0.01	18.05 ± 2.25	74.50 ± 26.15	9.55 ± 1.58	24.42 ± 3.02	76.92 ± 26.20
OVX/ORX	9.88 ± 0.94*	22.21 ± 2.46*	107.30 ± 29.12*	13.19 ± 5.33*	30.92 ± 3.15*	96.80 ± 24.20*
OVX/ORX + PTH	14.09 ± 1.61*†	25.27 ± 4.57*	126.50 ± 42.09*	14.37 ± 7.29*	35.55 ± 4.97*	111.43 ± 28.74*
SHAMF1/SHAMM1	5.20 ± 0.81	11.86 ± 2.73	84.25 ± 33.84	9.47 ± 5.36	21.14 ± 3.22	94.73 ± 28.63
OVX1/ORX1	7.00 ± 1.48*	17.66 ± 3.09*	107.08 ± 28.24*	10.37 ± 2.76	27.72 ± 4.67*	88.45 ± 22.44
SHAMF2/SHAMM2	7.10 ± 2.43	9.37 ± 2.07	80.40 ± 32.23	9.34 ± 4.82	19.83 ± 2.23	138.20 ± 41.22
OVX2/ORX2	8.86 ± 2.17	17.54 ± 2.48*	126.40 ± 35.13*	10.77 ± 4.24	26.86 ± 3.96*	96.93 ± 31.99*
OVX2/ORX2 + PTH	9.36 ± 2.40	18.36 ± 2.92*	122.60 ± 40.04*	10.15 ± 3.15	28.30 ± 4.90*	91.00 ± 18.37*

CTX, serum C-telopeptide of type I collagen (ng/ml); BGP, serum Bone Gla Protein (ng/ml); ALP, serum alkaline phosphatase (IU).

Statistical significance  $p < 0.05$ : \*vs. SHAM/SHAM1/SHAM2; †vs. OVX/OVX1/OVX2 or ORX/ORX1/ORX2.

Table II. Bone mineral density (BMD) ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) measured in femur (FBMD) and in lumbar vertebra (LBMD).

	Females		Males	
	FBMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	LBMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	FBMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	LBMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )
SHAMF/SHAMM	0.293 ± 0.016	0.231 ± 0.011	0.311 ± 0.019	0.251 ± 0.018
OVX/ORX	0.284 ± 0.012	0.225 ± 0.013	0.309 ± 0.022	0.244 ± 0.0005
OVX/ORX + PTH	0.324 ± 0.016*†	0.263 ± 0.017*†	0.332 ± 0.008*†	0.272 ± 0.017*†
SHAMF1/SHAMM1	0.311 ± 0.013	0.255 ± 0.024	0.325 ± 0.028	0.255 ± 0.019
OVX1/ORX1	0.257 ± 0.004*	0.211 ± 0.006*	0.311 ± 0.016*	0.249 ± 0.008
SHAMF2/SHAMM2	0.305 ± 0.020	0.246 ± 0.023	0.306 ± 0.021	0.265 ± 0.019
OVX2/ORX2	0.265 ± 0.016*	0.213 ± 0.013*	0.276 ± 0.020*	0.222 ± 0.018*
OVX2/ORX2 + PTH	0.270 ± 0.017*	0.230 ± 0.026	0.306 ± 0.017†	0.257 ± 0.006†

Statistical significance  $p < 0.05$ : \*vs. SHAM/SHAM1/SHAM2; †vs. OVX/OVX1/OVX2 or ORX/ORX1/ORX2.



PTH) produced a significant increase in FBMD and LBMD with respect to the SHAM group (SHAMF). Administration of PTH to rats with established osteopenia 6 months after ovariectomy restored the levels of LBMD of OVX rats but could not restore the normal levels of FBMD.

**Males.** No differences in femoral or lumbar BMD were found between ORX and SHAMM groups 2.5 months after orchidectomy (Table II). However, FBMD was significantly decreased in rats that were sacrificed 6 months after orchidectomy but LBMD was not. After 8.5 months of orchidectomy, both FBMD and LBMD were significantly decreased.

PTH treatment for 2.5 months starting immediately after orchidectomy (ORX + PTH) produced a significant increase in FBMD and LBMD with respect to the SHAMM group. Administration of PTH to rats with established osteopenia 6 months after orchidectomy (ORX2 + PTH) restored BMD levels at femoral and lumbar level.

#### *Bone histology and histomorphometry*

**Females.** Table III shows bone histomorphometry measurements from lumbar vertebra, tibial metaphysis and diaphysis. OVX rats had a decrease in bone mass with BA/TA rates lower than their paired SHAMF. Trabecular bone loss was more severe in tibia metaphysis than in lumbar vertebra, and these changes were depicted in Figure 3. In OVX1 and OVX2 rats an osteopenia was established, but there were no differences among them. In metaphysis, bone loss occurred chiefly in central zone and trabecular elements, as seen directly by stereoscopic microscopy (Figure 3). In OVX rats bone loss also affected cortical bone, higher values being apparent for medullar area and decreased cortical thickness in all groups.

In the preventive experiment (study A), PTH effects were noted in vertebral trabecular bone and metaphysis with values that were higher than OVX group and similar to SHAMF group. Nevertheless, in cortical bone PTH had a dual effect increasing resorption at the endosteal surface (higher medullar area values) and new bone formation at the periosteal side, though the net effect was a thicker cortical. These histological changes, i.e., endosteal resorption and periosteal bone formation were assessed in toluidine-blue-stained sections (Figure 4). In the intervention experiment (study B), PTH treatment did not produce observable effects on vertebral trabecular bone and tibial metaphysis when compared with OVX2 group. On the contrary, PTH effects on cortical bone were noted as lower medullar area and higher cortical thickness. Figure 4 confirmed histologically that new bone was deposited in both endosteal and periosteal surfaces.

**Males.** Table III shows bone histomorphometry measurements for male groups. In ORX rats, there

was a trabecular-bone decrease in lumbar vertebra and in metaphysis. Bone loss was even continued in ORX2 group (Figure 5). Beside this bone loss, another histological trait was significant in ORX rats, viz., the existence of wide osteoid seams (Figure 6), indicating that following androgen depletion, there was an impaired mineralisation. Nevertheless, cortical bone responded differently, bone cortical loss was only noticed in ORX2 (higher medullar area and lower cortical thickness). Wider osteoid seams in cortical bone were also detected (Figure 7).

In study A, ORX + PTH bone mass values were similar to SHAM and higher than ORX group. Particularly, Tb.Th values were higher, a circumstance explained by the fact that PTH notably improved mineralisation of the osteoid (Figure 6). In cortical bone a significant reduction in medullar area was seen. It depended on new bone formation at the endosteal envelope that was confirmed by histology (Figure 7). In study B, bone trabecular rates were maintained at similar level to ORX1, both in lumbar vertebra and in metaphysis. In cortical bone, PTH new bone formation both at endosteal and periosteal surfaces was confirmed by histology (Figure 7). Consequently cortical bone had higher values for bone cortical area and cortical thickness, and lower values for medullar area.

#### *Bone mineralisation degree*

**Females.** In study B, baseline OVX1 group showed lower mineralisation degree than their paired SHAMF1. Figure 8a shows mineral content profile for females at the end of experiment, OVX2 and OVX2 + PTH showed a decrease in mineral content profile (curves shifted to the left). With PTH treatment, curves are even more shifted, but in this case, it was the result of new bone formation (that is always less mineralised than old bone).

**Males.** ORX1 showed lower mineralisation degree than SHAMM1. The same trends were seen in ORX2 and ORX2 + PTH with curves shifted to left (Figure 8b). In PTH treated rats, colour-coded mineralisation maps showed new bone formation (blue colour) both at endosteal and periosteal surfaces that was confirmed at higher magnifications (Figure 9).

#### *Biomechanical testing*

**Females.** The results obtained when torsion assays were performed show (Table IV) that ovariectomy produced a significant decrease in maximum torque in rats 2.5 months (OVX), 6 months (OVX1) and 8.5 months (OVX2) after ovariectomy. Six months (OVX1) and 8.5 months after ovariectomy (OVX2), maximum angle of torsion necessary to produce bone fracture, was significantly decreased with respect to the respective SHAMF groups. However, 2.5

Table III. Bone histomorphometry of lumbar vertebra (L4) and tibia.

	Females				Males			
	Lumbar vertebrae (trabecular bone)				Lumbar vertebrae (trabecular bone)			
	BA/TA (%)	Tb.Th ( $\mu\text{m}$ )	Tb.Sp ( $\mu\text{m}$ )	Tb.N ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	BA/TA (%)	Tb.Th ( $\mu\text{m}$ )	Tb.Sp ( $\mu\text{m}$ )	Tb.N ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )
SHAMF/SHAMM	39.5 $\pm$ 5	80 $\pm$ 7	153 $\pm$ 40	4.36 $\pm$ 0.6	28.2 $\pm$ 2	82 $\pm$ 8	208 $\pm$ 24	3.46 $\pm$ 0.3
OVX/ORX	25.3 $\pm$ 3*	67 $\pm$ 8*	200 $\pm$ 30*	3.7 $\pm$ 0.3	23.1 $\pm$ 3*	80 $\pm$ 5	271 $\pm$ 50*	2.88 $\pm$ 0.4*
OVX/ORX + PTH	32.7 $\pm$ 2* <sup>†</sup>	82 $\pm$ 8 <sup>†</sup>	171 $\pm$ 26	3.99 $\pm$ 0.5	32.1 $\pm$ 7 <sup>†</sup>	99 $\pm$ 20 <sup>†</sup>	212 $\pm$ 36 <sup>†</sup>	3.21 $\pm$ 0.2
SHAMF1/SHAMM1	35.5 $\pm$ 4	73 $\pm$ 11	188 $\pm$ 52	3.91 $\pm$ 0.7	28.2 $\pm$ 5	74 $\pm$ 3	198 $\pm$ 58	3.79 $\pm$ 0.7
OVX1/ORX1	23.4 $\pm$ 3*	72 $\pm$ 12	237 $\pm$ 37*	3.27 $\pm$ 0.4*	19.6 $\pm$ 3*	85 $\pm$ 12	335 $\pm$ 56*	2.40 $\pm$ 0.5*
SHAMF2/SHAMM2	37.1 $\pm$ 5	78 $\pm$ 11	181 $\pm$ 45	3.90 $\pm$ 0.5	29.7 $\pm$ 6	82 $\pm$ 3	199 $\pm$ 53	3.60 $\pm$ 0.6
OVX2/ORX2	23.3 $\pm$ 4*	76 $\pm$ 2	260 $\pm$ 68*	3.05 $\pm$ 0.6*	18.6 $\pm$ 2*	75 $\pm$ 10	325 $\pm$ 31*	2.50 $\pm$ 0.25*
OVX2/ORX2 + PTH	25.1 $\pm$ 2*	83 $\pm$ 9	220 $\pm$ 59	3.38 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 6 <sup>†</sup>	79 $\pm$ 12	258 $\pm$ 65 <sup>†</sup>	3.02 $\pm$ 0.54 <sup>†</sup>
Tibia (trabecular and cortical bone)								
	Tibia (trabecular and cortical bone)			Cortical thickness ( $\mu\text{m}$ )	Tibia (trabecular and cortical bone)			Cortical thickness ( $\mu\text{m}$ )
	Trabecular area ( $\text{mm}^2$ )	Cortical area ( $\text{mm}^2$ )	Medullar area ( $\text{mm}^2$ )		Trabecular area ( $\text{mm}^2$ )	Cortical area ( $\text{mm}^2$ )	Medullar area ( $\text{mm}^2$ )	
SHAMF/SHAMM	18.24 $\pm$ 3	3.98 $\pm$ 0.3	1.19 $\pm$ 0.2	596 $\pm$ 40	12.09 $\pm$ 2	5.54 $\pm$ 0.5	1.98 $\pm$ 0.5	667 $\pm$ 70
OVX/ORX	14.44 $\pm$ 3*	3.99 $\pm$ 0.1	1.38 $\pm$ 0.2*	570 $\pm$ 28*	7.62 $\pm$ 3*	5.81 $\pm$ 0.6	2.46 $\pm$ 0.5	646 $\pm$ 73
OVX/ORX + PTH	20.06 $\pm$ 3 <sup>†</sup>	4.7 $\pm$ 0.3* <sup>†</sup>	1.53 $\pm$ 0.3* <sup>†</sup>	634 $\pm$ 50* <sup>†</sup>	11.80 $\pm$ 3 <sup>†</sup>	5.88 $\pm$ 0.4	1.56 $\pm$ 0.3 <sup>†</sup>	700 $\pm$ 67
SHAMF1/SHAMM1	15.09 $\pm$ 2	3.87 $\pm$ 0.2	1.41 $\pm$ 0.2	547 $\pm$ 31	14.58 $\pm$ 3	5.49 $\pm$ 0.4	1.55 $\pm$ 0.4	714 $\pm$ 55
OVX1/ORX1	6.51 $\pm$ 1*	3.54 $\pm$ 0.3*	1.58 $\pm$ 0.3*	513 $\pm$ 34*	5.56 $\pm$ 2*	5.05 $\pm$ 0.4	2.44 $\pm$ 0.4	573 $\pm$ 44
SHAMF2/SHAMM2	18.06 $\pm$ 3	4.03 $\pm$ 0.4	1.43 $\pm$ 0.2	573 $\pm$ 47	11.70 $\pm$ 2	5.43 $\pm$ 0.1	1.16 $\pm$ 0.1	742 $\pm$ 13
OVX2/ORX2	7.51 $\pm$ 2*	3.9 $\pm$ 0.31	1.59 $\pm$ 0.3*	559 $\pm$ 34*	2.21 $\pm$ 0.8*	5.16 $\pm$ 0.1*	2.01 $\pm$ 0.1*	624 $\pm$ 7*
OVX2/ORX2 + PTH	7.92 $\pm$ 2*	4.13 $\pm$ 0.3 <sup>†</sup>	1.31 $\pm$ 0.2* <sup>†</sup>	615 $\pm$ 36* <sup>†</sup>	6.86 $\pm$ 2* <sup>†</sup>	5.68 $\pm$ 0.2*	1.63 $\pm$ 0.1* <sup>†</sup>	703 $\pm$ 27 <sup>†</sup>

Statistical significance  $p < 0.05$ ; \*<sub>vs</sub> SHAM/SHAM1/SHAM2; <sup>†</sup><sub>vs</sub> OVX/OVX1/OVX2 or ORX/ORX1/ORX2.

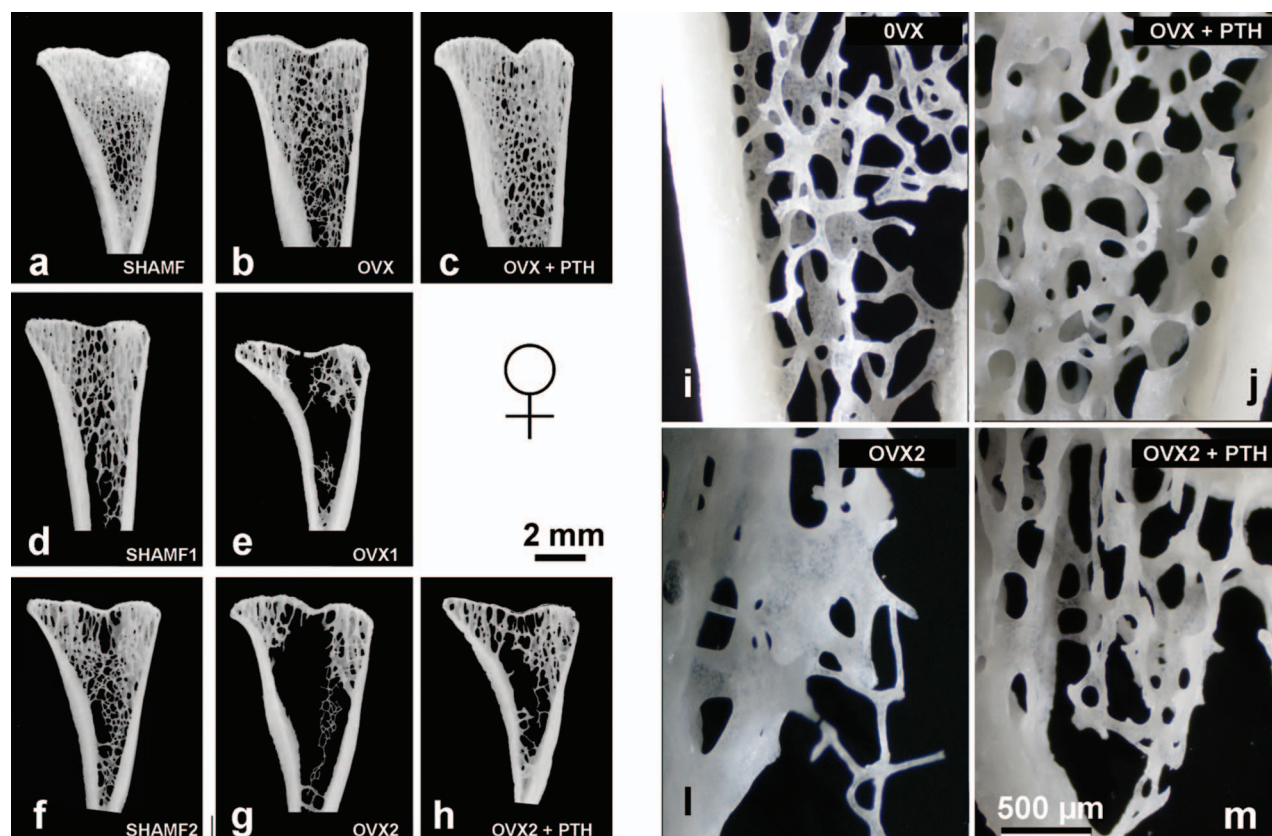


Figure 3. Tibial metaphysis from female rats. Representative anorganic sections from female rats in prevention (a–c) and intervention experiments (d–h). Note that in OVX groups (b,d,e) there is trabecular bone loss in the central zone. Detail of the trabecular microarchitecture (i–m) as viewed by stereoscopic zoom microscopy. Note in OVX2 (l) the extreme trabecular thinning.

months after ovariectomy we did not find a significant decrease of this parameter. Absorbed energy was also lower than that of the SHAMF group in all ovariectomised rat groups.

Parathyroid hormone treatment administered immediately after ovariectomy (OVX + PTH) avoided the decrease in maximum torque and absorbed energy. However, in our experimental conditions, PTH treatment for 2.5 months could not reverse the effects produced in maximum torque or absorbed energy in rats with established low bone mass (OVX2 + PTH) (Table IV). We found no differences in stiffness among all the studied groups.

**Males.** We found no significant difference in biomechanical parameters among orchidectomised, PTH-treated and their respective SHAMM groups (Table IV).

## Discussion

Previous studies, in which ovariectomised or orchidectomised rats were used as experimental models, employed rats younger than in the present study [27–30]. These works used rats between 3 and 6 months old, with sexual maturity but that were still growing. However, there are few studies in which old rats were used [31,32] and in the present work we used 9-month-old rats which had finished their growing

stage. In these conditions, experiments were more similar to the metabolic situation of humans who suffer osteoporosis for post-menopausal or androgenic-depletion reasons.

In previous works, the dosages of PTH administered to the rats were high (40, 80  $\mu\text{g/kg/day}$ ) [30,33] with respect to those used in the clinical practice, that usually are no higher than 2  $\mu\text{g/kg/day}$  [34–37]. In our experimental design we used 4  $\mu\text{g/kg/day}$  of PTH, a dosage closer to that used in humans. In a previous work, Turner et al. [38] demonstrated that high doses rates (80  $\mu\text{g/kg/day}$ ) of the hormone result in excessive stimulation of bone formation and an increase in trabecular thickness. At this point, it is important to emphasise that the dose of PTH employed in this work did not produce alterations in serum creatinine in any animal. In the same way, hypercalcemia was not produced in any case. Some authors observed in clinical studies that hypercalcemia after PTH treatment is dose-dependent [39,40]. It is also interesting to mention the fact that in this work we used rat PTH (1–34) instead of human PTH (1–34).

As expected, ovariectomy produced a high bone turnover, which slows down after the initial 6 months [25]. Initially, bone remodelling is increased, both at formation and resorption level. This fact has been described both in human and experimental animal model studies [19,41,42]. It is known that oestrogen lack produces a disorder in bone remodelling that



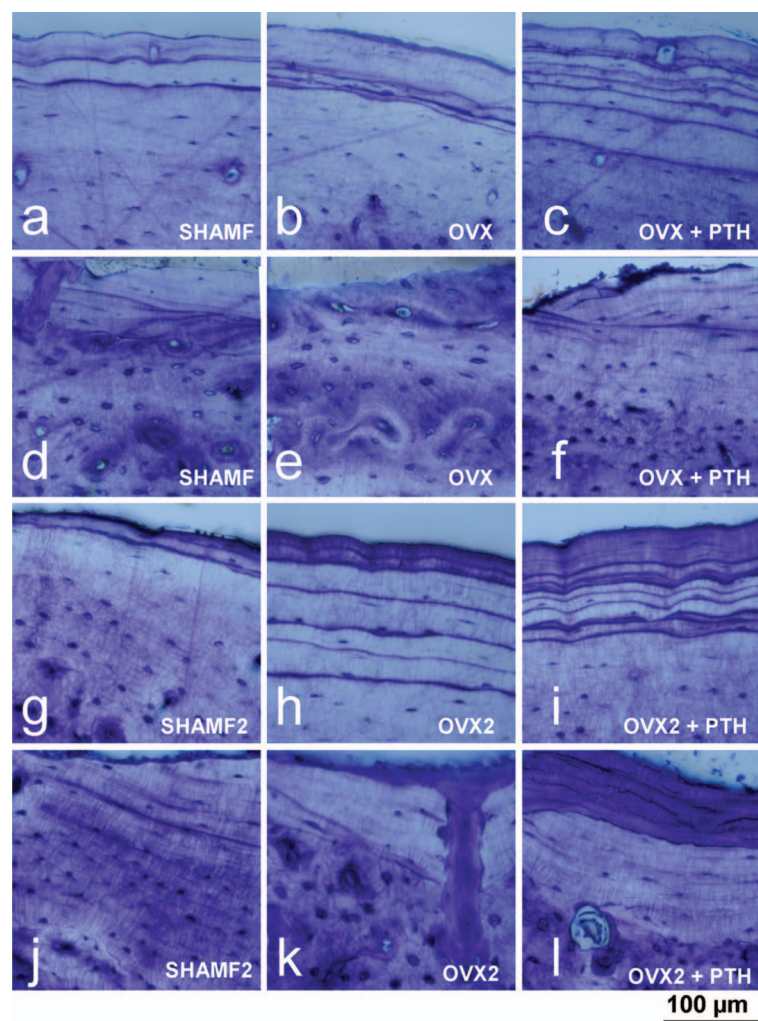


Figure 4. Tibia cortical bone from female rats. Periosteal and endosteal surfaces as view in 100  $\mu$ m thick ground sections stained with toluidine blue from prevention (a–f) and intervention experiments (g–l). Note that in prevention study PTH-treatment has a dual effect as new bone formation at periosteal envelope (c) and resorption at endosteal surface (f). On the contrary, in intervention experiment, PTH-treatment produces new bone both in periosteal (i) and endosteal (l) surfaces.

negatively affects bone integrity [43]. Although an increase in bone resorption is positive with respect to bone microfracture repair, the increase in bone resorption over bone formation exerts a bone loss net effect.

In the present work, bone loss 2.5 months after ovariectomy was not detectable by DEXA technique, but it was by means of histomorphometry. Previous studies demonstrated that trabecular area and BA/TA determinations were more sensitive than BMD [22]. However, induced osteopenia was severe 6 and 8.5 months after ovariectomy, and thus it was detectable both by DEXA and histomorphometry.

In our study, in untreated OVX groups, cancellous bone is lost in metaphysis and in lumbar vertebra, reaching a plateau 6 months after ovariectomy when bone turnover has reduced. In the same way, bone loss was detected in cortical bone due to resorption at endosteal envelopes. In OVX rats, bone mineralisation degree was also lower, as it was reported previously [25]. In fact, lower mineral profiles are expected in bone with high turnover

[20] as it is the case of ovariectomy. Our results showed that bone biomechanical properties of OVX rats were affected. In this work, we only studied biomechanical properties performing torsion assays. Other authors [29] found similar results after ovariectomy with bending studies.

Parathyroid hormone treatment for 2.5 months immediately after ovariectomy avoided bone loss in tibial metaphysis and partially in lumbar vertebra. Our results agree with those of Sato et al. [44] who administered 8 and 40  $\mu$ g/kg/day of PTH to ovariectomised, 9-month-old Sprague-Dawley rats, for 6 months, immediately after surgery.

However, PTH effects in cortical bone were different. Increased resorption at the endosteal surfaces (higher medullar area) and increased formation at periosteal surfaces (higher bone tissue area and cortical thickness) were seen at the same time. Nevertheless, tibia as a whole had net bone gain, a fact also reflected in biomechanical test since OVX + PTH returned to normal maximum torque values.

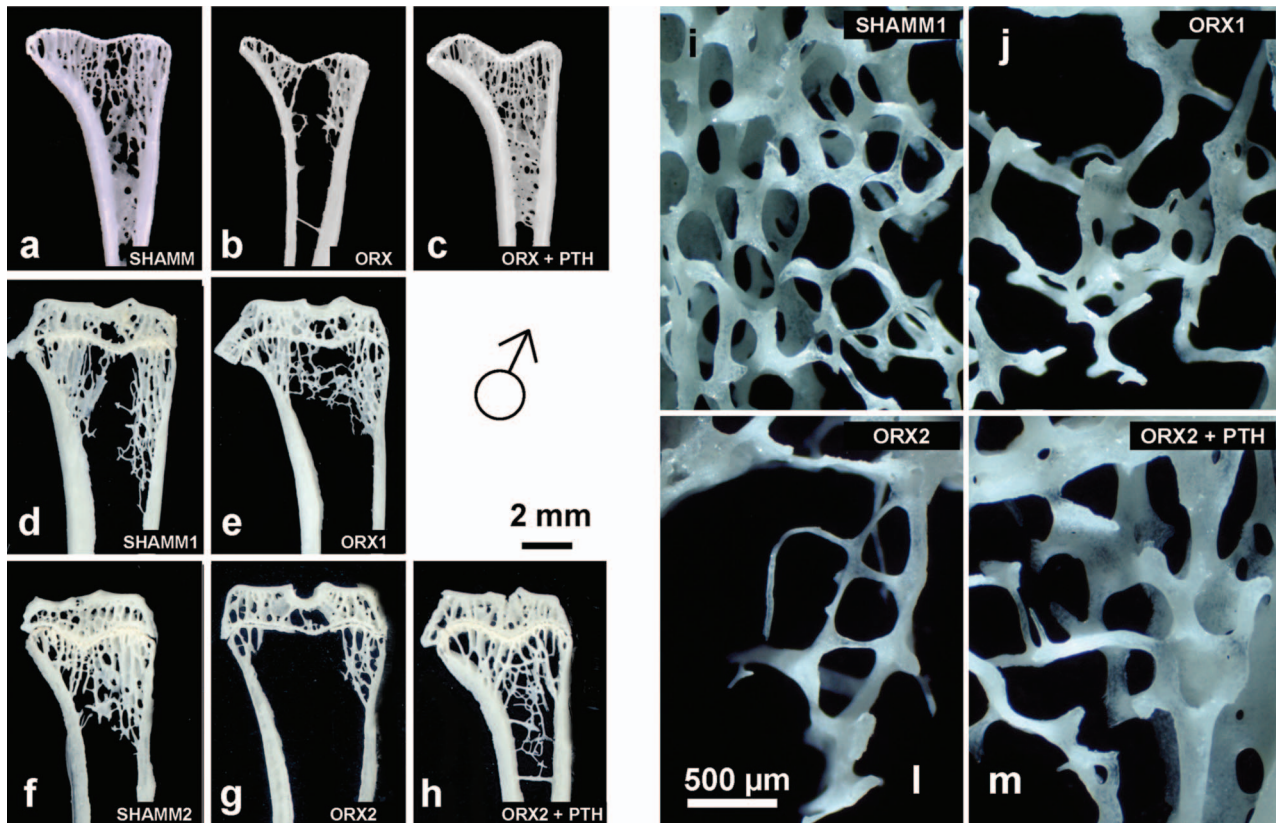


Figure 5. Tibia metaphysis from male rats. Representative anorganic sections from male rats in prevention (a–c) and intervention experiments (d–h). Note that in ORX groups (b,d,e) there is a progressive bone loss with time, and that in ORX2 group only lateral trabeculas remained. Detail of the microarchitecture of the metaphysis (i–m) as viewed by stereoscopic zoom microscopy. Note that the trabecular thinning in ORX2 (l), and in ORX2 + PTH (m) have a similar thickness to baseline ORX1 (h).

A different pattern is found when PTH treatment is given to rats 6 months after ovariectomy with induced osteopenia. In this case, PTH was not able to significantly reverse the negative effects produced by ovariectomy on BMD, BA/TA or trabecular area. In a previous work by Stewart et al. [29] PTH treatment (40  $\mu\text{g/kg/day}$ ) reversed the loss in trabecular area in rats ovariectomised at 5 months old and treated with PTH from 1 month to 7 months later. Moreover, after treatment, trabecular area of rats was higher than that of the SHAM group. In another work, Tsuchida et al. [45] administered PTH (6  $\mu\text{g/kg/day}$ ) and got increased trabecular connectivity in ovariectomised 7-month-old rats, without getting SHAM levels.

The differences between these results and those found by us in 18.5-old-month rats could be due to the different dose of PTH, treatment instauration time and duration as well as the age of rats used. In Stewart's report dose was 10 times higher than ours, and treatment lasted 6 months. In Tsuchida's report, dose is similar but treatment duration was 4 months. The PTH dose seems to be an important factor. Another important factor in PTH treatment could be the moment in which treatment is begun. In Stewart's report [29] PTH treatment was initiated only 1 month after ovariectomy, but in the present work, treatment was initiated 6 months after surgery.

In this respect, Tsuchida et al. [45] found that the recuperation of trabecular connectivity in ovariectomised rats with PTH treatment was better if this was started 1 month after ovariectomy rather than 3 months after surgery. These findings led these authors to suggest that there is a limit to the loss of trabecular connectivity after which it is not possible to recover bone mass with PTH treatment. On the other hand, it is important to take into account that PTH induces strong bone modelling in young rats while in mature rats remodelling becomes more important [46]. At this respect, Friedl et al. [47] studied the effects of PTH on rats with different ages, and concluded that while in fast-growing rats, PTH increased osteoblast activity, which resulted in retention of new trabeculae, in aged rats, in which quiescent bone surfaces covered with lining cells are increased, PTH is capable to increase osteoblast number, leading to a larger relative increase in surface referent bone formation rate than in younger rats.

In the intervention study, in spite of cancellous bone mass not being changed by PTH treatment in OVX rats, a significant increase in tibia cortical bone tissue area and cortical thickness were detected. In this situation, cortical bone responded with new bone formation at endosteal and periosteal envelopes, a fact also evidenced in our study of bone



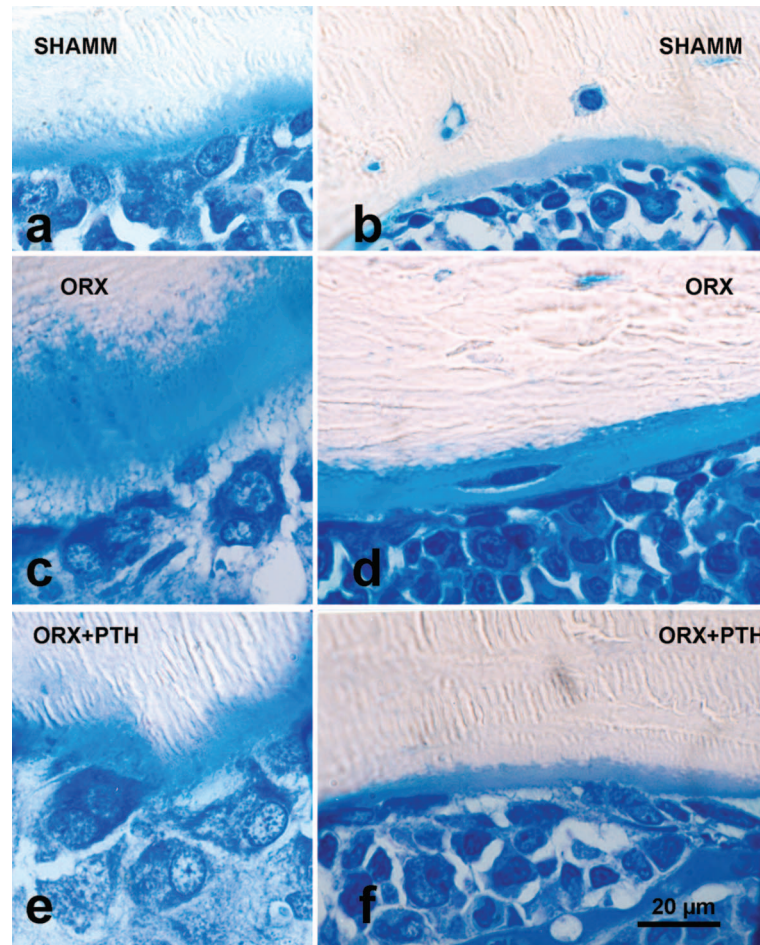


Figure 6. Lumbar vertebra from male rats. Early bone formation surfaces with cuboidal osteoblasts and osteoid seams (a,c,e) and late bone formation surfaces with elongated osteoblasts and osteoid seams (b,d,f) as shown in  $2.5\ \mu\text{m}$  sections stained with toluidine blue. Note that ORX group has wide osteoid seams throughout, but PTH treatment reverses impaired mineralisation.

mineral profile. Although total mineralisation degree was even lower than in ovariectomised rats, the curve was broader indicating that new bone, always less mineralised [25], had appeared. However, maximum torque and absorbed energy were not improved by new cortical bone formation.

On the whole, our results with OVX rats suggest that the dose of PTH used is adequate to prevent partially the loss of bone quality after ovariectomy, but this dose is not capable of fully recovering bone when it is severely affected by oestrogen lack. With respect to male rats, 2.5 months after orchidectomy an increase in bone remodelling was observed both at resorption (CTX) and formation (BGP and ALP) levels as previously reported [22]. Six and 8.5 months after surgery, CTX levels declined but levels of BGP were maintained. Interestingly, ALP was reduced, perhaps as a consequence of the impaired mineralisation of osteoid seams as was observed by histology.

Initial high bone turnover after orchidectomy induced a rapid cancellous bone loss. In metaphysis cancellous bone loss continued, and at 8.5 months after orchidectomy only lateral trabecular elements survived. However, cortical bone loss proceeded

slowly at endocortical surface, so cortical bone thinning was significant only 8.5 months after orchidectomy.

In a similar way to female rats, the decrease in BMD measured by DEXA, both in femur and vertebra, was not detected 2.5 months after orchidectomy, although it was detectable after 6 or 8.5 months. In the case of orchidectomy, bone loss (chiefly cancellous bone) after surgery did not produce variations in the analysed biomechanical properties, in spite of bone mineral content profile being lower. It is difficult to conclude whether differences between orchidectomy and ovariectomy biomechanics are due to dynamics of the bone remodelling or to other intrinsic factors associated to sex, bone size, geometry, cortical thickness, mineralisation or matrix composition. It is a fact that bone mass, bone size and cortical thickness in males are higher than in females determined in basal conditions and at the same age.

Parathyroid hormone treatment to orchidectomised male rats for 2.5 months, immediately after surgery, did not produce significant changes on bone remodelling with respect to the untreated orchidectomised group. However, in this case, in a similar

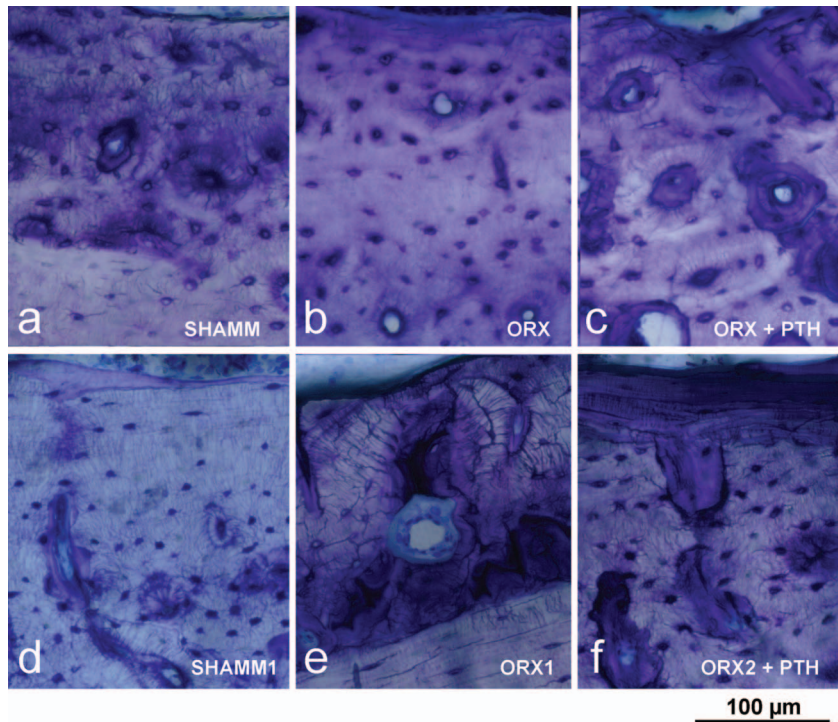


Figure 7. Tibia cortical bone from male rats. Endosteal surfaces in male rats as viewed in 100  $\mu\text{m}$ -thick ground sections stained with toluidine blue from preventive experiment (a–c) and from intervention experiment (d–f). Note that ORX1 cortical bone has a wide osteoid seam in an intracortical (remodelled) osteon (e), and that PTH treatment produces new bone formation both in prevention (c) and intervention experiments (f).

#### % CORTICAL BONE – MINERAL DENSITY PROFILE

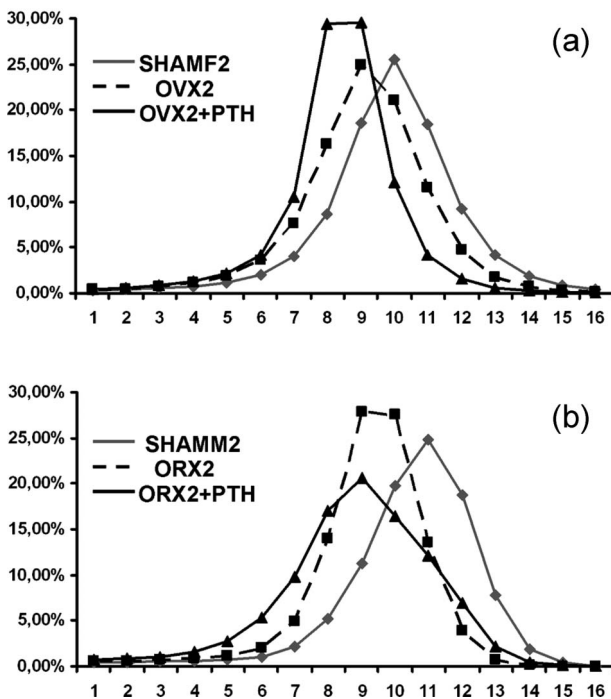


Figure 8. Mineral content profiles from females (a) and males (b). Both OVX2 and ORX2 had shifted curves to the left with respect to their SHAMF2 and SHAMM2 controls. With PTH treatment, curves are also left-shifted but broader indicating that new bone formation has occurred.

way to the study with female rats, there is a positive balance of formation over resorption, showing that ORX rats treated with PTH had higher levels of

femoral and lumbar BMD than the intact group. The preventive PTH treatment restored tibia metaphysis and lumbar vertebra trabecular bone values similar to its paired SHAM. Thickening of trabeculas was notable, and it is due not only to increased formation but to normal mineralisation of the osteoid. The preventive treatment did not affect biomechanical bone parameters, suggesting that PTH does not produce negative effects on bone fragility.

In the case of PTH treatment applied to orchidectomised male rats with an established osteopenia 6 months after surgery, there were no significant observable variations in biochemical markers of bone turnover with respect to untreated rats. PTH treatment recovered partially control baseline bone cancellous mass in tibia metaphysis and lumbar vertebrae. In this context, Gabet et al. [30], using microtomography, found a significant, although incomplete, restoration in trabecular number in 13-week-old orchidectomised rats treated with 80  $\mu\text{g/kg/day}$  from 6 to 12 weeks after surgery. In another study, Oxlund et al. [48] found in 24-month-old male rats, with a deep osteopenia due to their age, that treatment with 62.5  $\mu\text{g/kg/day}$  for 56 days produced a significant increase in BA/TA.

Parathyroid hormone also restored tibia cortical bone thickness due to new bone formation at endosteal and periosteal surfaces, and in consequence mineralisation degree is lower than in the orchidectomised. In the same way as in females, curves are broader indicating a recent mineralisation [20], but these changes in mineralisation did not



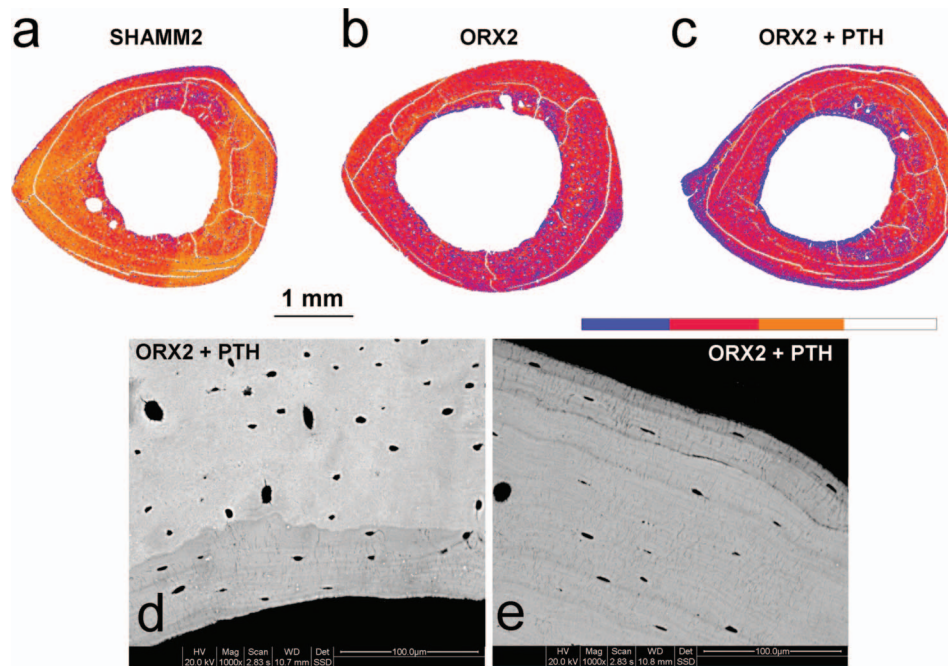


Figure 9. Colour-coded mineralisation maps from SHAMM2 (a), ORX2 (b), and ORX2 + PTH (c) obtained by BSI at  $\times 60$  magnification (pixel size =  $5.6 \mu\text{m}$ ). In the scale, blue colour indicates less mineralised bone, i.e., sites of new bone formation. Detail of new formation at endosteal (d) and periosteal (e) surfaces viewed at  $\times 1000$  magnification.

Table IV. Bone biomechanics measured in femurs.

	Females				Males			
	M. torque (Nm)	Angle ( $^{\circ}$ )	Stiffness (Nm/ $^{\circ}$ )	Abs E (J)	M. torque (Nm)	Angle ( $^{\circ}$ )	Stiffness (Nm/ $^{\circ}$ )	Abs E (J)
SHAMF/SHAMM	$0.44 \pm 0.05$	$15.27 \pm 3.42$	$0.037 \pm 0.012$	$3.84 \pm 0.87$	$0.45 \pm 0.17$	$9.51 \pm 2.37$	$0.059 \pm 0.030$	$2.32 \pm 0.84$
OVX/ORX	$0.25 \pm 0.13^*$	$11.99 \pm 3.26$	$0.034 \pm 0.017$	$1.74 \pm 0.77^*$	$0.47 \pm 0.16$	$7.70 \pm 3.56$	$0.064 \pm 0.028$	$2.00 \pm 1.24$
OVX/ORX + PTH	$0.47 \pm 0.07^{\dagger}$	$12.42 \pm 3.08$	$0.045 \pm 0.015$	$2.81 \pm 0.82$	$0.52 \pm 0.14$	$12.83 \pm 5.88$	$0.071 \pm 0.020$	$3.22 \pm 1.47$
SHAMF1/SHAMM1	$0.29 \pm 0.06$	$11.60 \pm 0.86$	$0.030 \pm 0.009$	$1.99 \pm 0.69$	$0.55 \pm 0.12$	$13.31 \pm 3.49$	$0.072 \pm 0.030$	$4.16 \pm 0.81$
OVX1/ORX1	$0.22 \pm 0.13^*$	$7.05 \pm 1.85^*$	$0.023 \pm 0.005$	$0.93 \pm 0.61^*$	$0.43 \pm 0.15$	$9.36 \pm 4.44$	$0.065 \pm 0.012$	$1.70 \pm 0.89$
SHAMF2/SHAMM2	$0.45 \pm 0.11$	$10.23 \pm 1.59$	$0.053 \pm 0.015$	$2.04 \pm 0.50$	$0.65 \pm 0.14$	$12.37 \pm 0.83$	$0.077 \pm 0.018$	$4.71 \pm 1.41$
OVX2/ORX2	$0.25 \pm 0.02^*$	$7.16 \pm 0.85^*$	$0.055 \pm 0.015$	$1.01 \pm 0.20^*$	$0.64 \pm 0.24$	$11.13 \pm 2.13$	$0.083 \pm 0.030$	$4.27 \pm 2.04$
OVX2/ORX2 + PTH	$0.28 \pm 0.07^*$	$8.62 \pm 1.63$	$0.055 \pm 0.008$	$1.40 \pm 0.39^*$	$0.62 \pm 0.13$	$9.84 \pm 3.14$	$0.090 \pm 0.017$	$3.59 \pm 1.62$

Maximum torque (M. torque) (Nm); maximum angle of torsion before break (Angle) ( $^{\circ}$ ), stiffness (Nm/ $^{\circ}$ ); and adsorbed energy before break (Abs E) (J).

Statistical significance  $p < 0.05$ :  $^*$ vs. SHAM/SHAM1/SHAM2;  $^{\dagger}$ vs. OVX/OVX1/OVX2 or ORX/ORX1/ORX2.

produce significant variations in the biomechanical parameters studied.

Our results with ORX rats suggest that the dose of PTH used in this work is adequate both to prevent the development of osteopenia after orchidectomy and to reverse the effects produced on bone by androgen lack, although incompletely, because BA/TA and trabecular number are not quite restored.

In conclusion, the results of the present work agree with previous works in the fact that both ovariectomy and orchidectomy produced significant

alterations in bone quality, remodelling, trabecular structure, mineralisation distribution and BMD. However, in similar conditions with respect to animal age and time of the experiment after hormonal depletion, oestrogen lack produced significant changes in biomechanical femoral properties in female rats, and androgen lack did not, a fact that indicates that oestrogenic lack produces more serious consequences in bone quality than androgenic lack. A dose of  $4 \mu\text{g/kg/day}$  of PTH administered for 2.5 months to castrated rats (females or males) immediately after surgery avoids the negative effects



produced by ovariectomy (this one only partially) and orchidectomy. Nevertheless, the same dose administered to osteopenic rats, beginning the treatment 6 months after castration, reverses the decrease in cortical thickness, but is not capable of fully restoring cancellous bone. These results suggest that it is possible that a limit exists in the level of bone loss and in the moment in which PTH treatment can be started, in order to get complete good results. If we attend to the results of the present work, we cannot reject that we could obtain better results with a higher dose of PTH and/or with more time of treatment.

Although it is not possible to extrapolate the results achieved in animals directly to humans, these experimental models let us study the mechanisms of bone loss produced after sexual hormone depletion, and the ability of PTH treatment to prevent or rescue these disorders.

### Acknowledgements

This work was supported by grants PI021038 and PI020646 from FIS, Instituto Carlos III, Spain.

### References

- Eastell R. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. In: Favus MJ, editor. *Metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5th ed. Washington: ASBMR; 2003. pp 314–316.
- Boonen S, Kaufman JM, Goemaere S, Bouillon R, Vanderschueren D. The diagnosis and treatment of male osteoporosis: Defining, assessing, and preventing skeletal fragility in men. *Eur J Intern Med* 2007;18:6–17.
- Riggs BL and Melton LJ 3rd. Bone turnover matters: the raloxifene treatment paradox of dramatic decreases in vertebral fractures without commensurate increases in bone density. *J Bone Miner Res* 2002;17:11–14.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention. Diagnosis and Therapy. *JAMA* 2001;285:785–795.
- González Macías J. Osteoporosis: definición y etiología. In: *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*, Santander, Spain: Jarpyo; 2004. pp 99–103.
- Turner CH. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int* 2002;13:97–104.
- Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N, Robinson V, Weaver B, Shea B, Wells G, Adachi J, Waldegger L, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VI. Meta-analysis of calcitonin for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:540–551.
- Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N, Robinson V, Weaver B, Adachi J, Wells G, Shea B, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IV. Meta-analysis of raloxifene for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:524–528.
- Cranney A, Guyatt G, Krolicki N, Welch V, Griffith L, Adachi JD, Shea B, Tugwell P, Wells G; Osteoporosis Research Advisory Group (ORAG). A meta-analysis of etidronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2001;12:140–151.
- Cranney A, Tugwell P, Adachi J, Weaver B, Zytaruk N, Papaioannou A, Robinson V, Shea B, Wells G, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. III. Meta-analysis of risedronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:517–523.
- Cranney A, Wells G, Willan A, Griffith L, Zytaruk N, Robinson V, Black D, Adachi J, Shea B, Tugwell P, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocr Rev* 2002;23:508–516.
- Vestergaard P, Jorgensen NR, Mosekilde L, Schwarz P. Effects of parathyroid hormone alone or in combination with antiresorptive therapy on bone mineral density and fracture risk – a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18:45–57.
- Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD, Sebert JL, Brandi ML, Albanese C, Lorenc R, Pors-Nielsen S, De Vernejoul MC, Roces A, Reginster JY. Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis – a 2-year randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2060–2066.
- Kleerekoper M. Osteoporosis prevention and therapy: preserving and building strength through bone quality. *Osteoporos Int* 2006;17:1707–1715.
- Tam CS, Heersche JN, Murray TM, Parsons JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 1982;110:506–512.
- Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, Shane E, Plavetic K, Muller R, Bilezikian J, Lindsay R. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 2001;16:1864–1853.
- Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 2007;40:1434–1446.
- Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP, Orwoll E, Yuen CK. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 2005;26:688–703.
- Eastell R, Barton I, Hannon RA, Chines A, Garnerio P, Delmas PD. Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. *J Bone Miner Res* 2003;18:1051–1056.
- Ruffoni D, Frazzini P, Roschger P, Klaushofer K, Weinkamer R. The bone mineralization as a fingerprint of the mineralization process. *Bone* 2007;40, 1308–1319.
- Diaz-Curiel MD, Calero JA, Guerrero R, Gala J, Gazapo R, de la Piedra C. Effects of LY-117018 HCl on bone remodeling and mineral density in the oophorectomized rat. *The Am J Obstet Gynecol* 1998;178:320–325.
- Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 2000;15:1085–1098.
- Gala Paniagua J, Diaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo Garcia M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Brit J Radiol* 1998;71:754–758.
- Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. A new method of comprehensive static histomorphometry applied on human lumbar vertebral cancellous bone. *Bone* 2000;27:129–138.
- Kneissel M, Boyde A, Gasser JA. Bone tissue and its mineralization in aged estrogen-depleted rats after long-term intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH)

- analog SDZ PTS 893 or human PTH (1-34). *Bone* 2001;28:237-250.
26. Gomez S, and Boyde A. Correlated alkaline phosphatase histochemistry and quantitative backscattered electron imaging in the study of rat incisor ameloblasts and enamel mineralization. *Microsc Res Tech* 1994;29:29-36.
27. Sogaard CH, Mosekilde L, Thomsen JS, Richards A, McOsker JE. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. *Bone* 1997;20:439-449.
28. Turner RT, Evans GL, Cavolina JM, Halloran B, Morey-Holton E. Programmed administration of parathyroid hormone increases bone formation and reduces bone loss in hindlimb-unloaded ovariectomized rats. *Endocrinology* 1998;139:4086-4091.
29. Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 2000;15:1517-1525.
30. Gabet Y, Kohavi D, Müller R, Chorev M, Bab I. Intermittently administered parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss and structural impairment in orchietomized adult rats. *Osteoporos Int* 2005;16:1436-1443.
31. Qi H, Li M, Wronski TJ. A comparison of the anabolic effects of parathyroid hormone at skeletal sites with moderate and severe osteopenia in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1995;10:948-955.
32. Banu J, Kalu DN. Effects of cerivastatin and parathyroid hormone on the lumbar vertebra of aging male Sprague-Dawley rats. *Bone* 2002;31:173-179.
33. Zhang KQ, Chen JW, Li GF, Tian XY, Huang LF, Bao LH, Wang ML. Effect of intermittent injection of recombinant human parathyroid hormone on bone histomorphometry of ovariectomized rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:659-662.
34. Rittmaster RS, Bolognese M, Ettinger MP, Hanley DA, Hodsman AB, Kendler DL, Rosen CJ. Enhancement of bone mass in osteoporotic women with parathyroid hormone followed by alendronate. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2129-2134.
35. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garner P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ; PTH Study Investigators. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1207-1215.
36. Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1216-1226.
37. Zanchetta JR, Bogado CE, Ferretti JL, Wang O, Wilson MG, Sato M, Gaich GA, Dalsky GP, Myers SL. Effects of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] on cortical bone in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2003;18:539-543.
38. Turner RT, Evans GL, Lotinun S, Lapke PD, Iwaniec UT, Morey-Holton E. Dose-response effects of intermittent PTH on cancellous bone in hindlimb unloaded rats. *J Bone Miner Res* 2007;22:64-71.
39. Crandall C. Parathyroid hormone for treatment of osteoporosis. *Arch Intern Med* 2002;162:2297-2309.
40. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-1441.
41. Dempster DW and Lindsay R. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 1993;341:797-801.
42. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994;15:275-300.
43. Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 1999;13:819-28.
44. Sato M, Zeng GQ, Turner CH. Biosynthetic human parathyroid hormone (1-34) effects on bone quality in aged ovariectomized rats. *Endocrinology* 1997;138:4330-4337.
45. Tsuchida T, Miyakoshi N, Kudo T, Tamura Y, Kasukawa Y, Suzuki K, Sato K. Restoring effect of human parathyroid hormone (1-34) on trabecular connectivity in ovariectomized rats. *Tohoku J Exp Med* 2001;194:213-221.
46. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995;136:3632-3638.
47. Friedl G, Turner RT, Evans GL, Dobnig H. Intermittent parathyroid hormone (PTH) treatment and age-dependent effects on rat cancellous bone and mineral metabolism. *J Orthop Res* 2007;25:1454-1464.
48. Oxlund H, Dalstra M, Ejersted C, Andreassen TT. Parathyroid hormone induces formation of new cancellous bone with substantial mechanical strength at a site where it had disappeared in old rats. *Eur J Endocrinol* 2002;146:431-438.